(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2003/072134

発行日　平成17年6月16日(2005.6.16)

(43)国際公開日　平成15年9月4日(2003.9.4)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
A61K 39/395	A61K	39/395	D
A61P 11/00	A61K	39/395	U
A61P 29/00	A61P	11/00	
A61P 37/06	A61P	29/00	
G01N 33/53	A61P	37/06	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 92 頁）　最終頁に続く

出願番号	特願2003-570878(P2003-570878)
(21)国際出願番号	PCT/JP2003/002372
(22)国際出願日	平成15年2月28日(2003.2.28)
(31)優先権主張番号	特願2002-54764(P2002-54764)
(32)優先日	平成14年2月28日(2002.2.28)
(33)優先権主張国	日本国(JP)
(81)指定国	AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人　000001029
協和醗酵工業株式会社
東京都千代田区大手町１丁目６番１号

(74)代理人　100105647
弁理士　小栗　昌平

(74)代理人　100105474
弁理士　本多　弘徳

(74)代理人　100108589
弁理士　市川　利光

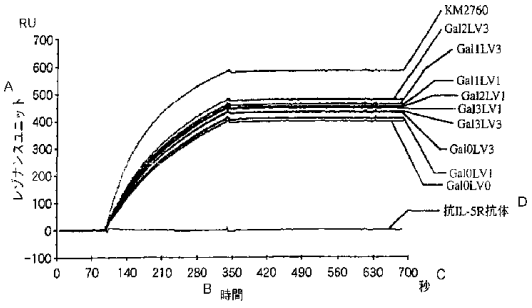
(74)代理人　100115107
弁理士　高松　猛

(74)代理人　100090343
弁理士　濱田　百合子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】間質性肺炎の診断薬および治療薬

(57)【要約】
抗ＣＣＲ４抗体および／または抗ＣＸＣＲ３抗体を有効成分として含有する、間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬、抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体とを有効成分として含有する、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別する診断薬、および抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体を用いて試料中のＴｈ２細胞とＴｈ１細胞とを検出および／または定量することを特徴とする、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎との判別方法。



A...RESONANCE UNIT
B...TIME
C...SECOND
D...ANTI-IL-5R ANTIBODY

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗ＣＣＲ４抗体および／または抗ＣＸＣＲ３抗体を有効成分として含有する、間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項２】
間質性肺炎が、定型例特発性間質性肺炎または非定型例特発性間質性肺炎である、請求の範囲１記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項３】
間質性肺炎が、膠原病における間質性肺炎である、請求の範囲１記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項４】
抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体とを有効成分として含有する、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別する診断薬。
【請求項５】
抗ＣＣＲ４抗体が、ＣＣＲ４の細胞外領域に特異的に結合する抗体である、請求の範囲１～４のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項６】
細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１～３９、９８～１１２、１７６～２０６および２７１～２８４番目からなる群から選ばれる細胞外領域である、請求の範囲５記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項７】
細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の２～２９番目に存在するエピトープである、請求の範囲５記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項８】
細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１３～２９番目に存在するエピトープである、請求の範囲５記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項９】
抗ＣＣＲ４抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求の範囲１～８のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１０】
抗ＣＣＲ４抗体が、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片である、請求の範囲１～８のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１１】
遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体およびその抗体断片から選ばれる抗体である、請求の範囲１０記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１２】
ヒト化抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）の相補性決定領域（ＣＤＲ）１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、請求の範囲１１記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１３】
ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相補性決定領域（ＣＤＲ）移植抗体およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、請求の範囲１１または１２記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１４】
ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）と軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、および

ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）とＬ鎖Ｃ領域
を含む、請求の範囲１３記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１５】
ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、請求の範囲１３または１４記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１６】
ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲１３～１５のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１７】
ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、形質転換体ＫＭ２７６０（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０５４）が生産する抗体ＫＭ２７６０またはその抗体断片である、請求の範囲１３～１６のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１８】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲを
含む、請求の範囲１３記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項１９】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、および
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）
を含む、請求の範囲１３記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項２０】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）、および
ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）およびＬ鎖Ｃ領域
を含む、請求の範囲１３記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項２１】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、請求の範囲１３および１８～２０のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
【請求項２２】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０で示されるアミノ酸配列のうち、４０番目のＡｌａ、４２番目のＧｌｙ、４３番目のＬｙｓ、４４番目のＧｌｙ、７６番目のＬｙｓ、および９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または

配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、請求の範囲１３および１８～２１のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項２３】

ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１１で示されるアミノ酸配列のうち、２８番目のＴｈｒおよび９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、請求の範囲１３および１８～２１のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項２４】

ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０、１１、１３～１８から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２、１９～２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲１３および１８～２１のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項２５】

ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１３から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲１３および１８～２１のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項２６】

ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１４から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲１３および１８～２１のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項２７】

ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＦＥＲＭ　ＢＰ－８１２９およびＦＥＲＭ　ＢＰ－８１３０からなる群から選ばれる形質転換株から生産されるヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片である、請求の範囲１３および１８～２１のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項２８】

抗体断片が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、２量体化可変領域（Ｖ領域）断片（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域断片（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる抗体断片である、請求の範囲９～２７のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項２９】

請求の範囲９～２８のいずれか１項に記載の抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合している、請求の範囲９～２８のいずれか１項の予防薬、診断薬または治療薬。

【請求項３０】
抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体を用いて試料中のＴｈ２細胞とＴｈ１細胞とを検出および／または定量することを特徴とする、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎との判別方法。
【請求項３１】
抗ＣＣＲ４抗体が、ＣＣＲ４の細胞外領域に特異的に結合する抗体である、請求の範囲３０記載の方法。
【請求項３２】
細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１～３９、９８～１１２、１７６～２０６および２７１～２８４番目からなる群から選ばれる細胞外領域である、請求の範囲３１記載の方法。
【請求項３３】
細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の２～２９番目に存在するエピトープである、請求の範囲３１記載の方法。
【請求項３４】
細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１３～２９番目に存在するエピトープである、請求の範囲３１記載の方法。
【請求項３５】
抗ＣＣＲ４抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求の範囲３１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
抗ＣＣＲ４抗体が、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片である、請求の範囲３１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体およびその抗体断片から選ばれる抗体である、請求の範囲３６記載の方法。
【請求項３８】
ヒト化抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）の相補性決定領域（ＣＤＲ）１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、請求の範囲３７記載の方法。
【請求項３９】
ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相補性決定領域（ＣＤＲ）移植抗体およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、請求の範囲３７または３８記載の方法。
【請求項４０】
ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）と軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、および
ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）とＬ鎖Ｃ領域
を含む、請求の範囲３９記載の方法。
【請求項４１】
ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、請求の範囲３９または４０記載の方法。
【請求項４２】

ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲３９～４１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４３】
ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、形質転換体ＫＭ２７６０（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０５４）が生産する抗体ＫＭ２７６０またはその抗体断片である、請求の範囲３９～４２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４４】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲを含む、請求の範囲３９記載の方法。

【請求項４５】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、および
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）
を含む、請求の範囲３９記載の方法。

【請求項４６】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）、および
ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）およびＬ鎖Ｃ領域
を含む、請求の範囲３９記載の方法。

【請求項４７】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、請求の範囲３９および４４～４６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４８】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０で示されるアミノ酸配列のうち、４０番目のＡｌａ、４２番目のＧｌｙ、４３番目のＬｙｓ、４４番目のＧｌｙ、７６番目のＬｙｓ、および９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、請求の範囲３９および４４～４７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４９】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１１で示されるアミノ酸配列のうち、２８番目のＴｈｒおよび９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他の

アミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、請求の範囲３９および４４～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０、１１、１３～１８から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２、１９～２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲３９および４４～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５１】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１３から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲３９および４４～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５２】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１４から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、請求の範囲３９および４４～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】
ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＦＥＲＭ　ＢＰ－８１２９およびＦＥＲＭ　ＢＰ－８１３０からなる群から選ばれる形質転換株から生産されるヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片である、請求の範囲３９および４４～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
抗体断片が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、２量体化可変領域（Ｖ領域）断片（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域断片（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる抗体断片である、請求の範囲３５～５３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
請求の範囲３５～５４のいずれか１項に記載の抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合している、請求の範囲３５～５４のいずれか１項の方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、抗ＣＣＲ４（ＣＣケモカイン受容体４）抗体および／または抗ＣＸＣＲ３（ＣＲＣケモカイン受容体３）抗体を有効成分として含有する、間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬、および抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体を用いる定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別する診断薬および判別方法に関する。
背景技術
特発性間質性肺炎は、原因不明の炎症性肺疾患であり、男性では比較的高齢者に見られ、有病率は人口１０万対３．４程度とされている。慢性型の特発性間質性肺炎は、定型例（ｉｄｉｏｐａｔｈｉｃ　ｐｕｌｍｏｎａｒｙ　ｆｉｂｒｏｓｉｓ；ＩＰＦ）と非定型例（ｎｏｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｉｎｔｅｒｓｔｉｔｉａｌ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａ；ＮＳＩＰ）とに分類されるが、その相異は主としてＸ線所見に基づくものである。特発性間質性肺炎の特徴としては、病理学的には、単核球の肺組織への集積とそれに引き続くコラーゲン等の沈着、繊維化の進展があげられ、これにより肺組織の破壊、呼吸機能の低下をきたす。定型例、非定型例共に病理学的な特徴はほぼ同様である。定型例および非定型例の病巣局所には単核球、特にＣＤ４陽性Ｔ細胞の浸潤が観察されていることから、病態形成には

免疫学的な機序が関与することが推察される。しかしながら、免疫学的な機序の詳細は不明であり、特発性間質性肺炎の成因、定型例と非定型例の病態の相異等に関しては解明されていない。

また、間質性肺炎はエリテマトーデス、関節リウマチ（ＲＡ：ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ）、強皮症を始めとする膠原病においても頻繁に観察される症状として知られている。その頻度は、強皮症において５０～７０％以上と最も高く、関節リウマチでは５～２０％とされている（最新内科学大系、免疫・アレルギー性疾患３（１９９３））。患者は息切れ等の症状を呈するが、膠原病における間質性肺炎に対する有効な治療法は知られておらず、現状の治療法に対しては一般に抵抗性である。膠原病における肺病変の成因に関しては殆ど解明されていない。

炎症病態は、自己免疫、感染、アレルギー、移植片拒絶等で多く認められ、共通してＴ細胞を始めとする炎症性細胞の集積が認められる。

近年の免疫学の進展により、ＣＤ４陽性Ｔ細胞は様々な疾患において中心的な役割を担うことが明らかにされた。ＣＤ４陽性Ｔ細胞は、その生産するサイトカインの種類により、Ｔｈ１細胞およびＴｈ２細胞の大きく二種類のタイプに分別される（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，７，１４５（１９８９））。Ｔｈ１細胞は主としてインターフェロン－γ、インターロイキン－２等を生産し、細胞性免疫に関与するものと考えられている。Ｔｈ２細胞はインターロイキン－４、－５、及び－１３などのサイトカインを分泌することにより液性免疫反応を制御するものと考えられている。炎症局所においてはＴ細胞の集積が認められるが、炎症部位においては異なるＴ細胞亜集団が集積する。例えば、慢性関節リウマチではＴｈ１細胞が、気管支喘息等のアレルギー性疾患ではＴｈ２細胞が有意に集積している（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ，２１，１８３（２０００））。

これは、例えば、気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液あるいは気道粘膜にはＴｈ２細胞が存在し（Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，３２６，２９８（１９９２）、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２３，１４４５（１９９３））、喘息モデル動物においても喘息病態形成へのＴｈ２細胞の関与が示されている（Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．，７５，７５（１９９５）、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１８６，１７３７（１９９７）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６０，１３７８（１９９８）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１，３１２８（１９９８））。これらの知見は、Ｔｈ２細胞の制御、あるいはＴｈ２細胞が生産するサイトカインの活性の制御が喘息治療に重要であると考えられている根拠でもある（Ｎａｔｕｒｅ，４０２，Ｂ３１（１９９９））。実際に、Ｔｈ２細胞を制御することをコンセプトとした開発中の喘息治療薬としては、ヒト化抗インターロイキン－５抗体（ＳＢ－２４０５６３：グラクソ・スミスクライン・ビーチャム社、ＳＣＨ－５５７００：シェーリング・プラウ／セルテック社製）、ヒト化抗インターロイキン－４抗体（ＵＳ Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏ．５，９１４，１１０）、可溶性インターロイキン受容体（Ｎｕｖａｎｃｅ：イムネックス社製）、ヒト化抗インターロイキン－５受容体抗体（ＷＯ９７／１０３５４）、抗ＣＣＲ８抗体（ＷＯ９９／２５７３４）、抗ＣＣＲ４抗体（ＷＯ０１／６４７５４）等をあげることができる。

Ｔｈ１細胞、Ｔｈ２細胞等の各白血球表面には、各種ケモカイン受容体が発現しており、それぞれ発現するケモカイン受容体は異なることが示されている（Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ，２１，４１８（２０００））。ケモカインは、白血球遊走および白血球活性化作用を有する塩基性のヘパリン結合性蛋白質の総称であり、数多くの受容体が同定されている（Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１１，６２６（１９９９））。

ヒトＣＣＲ４は、ヒト未熟好塩基球細胞株ＫＵ－８１２から遺伝子がクローニングされたケモカイン受容体であり（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７０，１９４９５（１９９５））、そのリガンドはＴＡＲＣ（ｔｈｙｍｕｓ ａｎｄ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ－ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ）、ＭＤＣ（ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ）であることが明らかにされている（Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１１，６２６（１９９９））。さらには、近年の検討により、ＣＣＲ４はＴｈ２細胞に選択的に発現されていることが明らかにされており（Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１

８７，１２９（１９９８）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１，５１１１（１９９８）、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１１，８１（１９９９）、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１０８，１３３１（２００１））、ＣＣＲ４およびそのリガンドはＴｈ２細胞の遊走、活性化を介して炎症反応に関与していることが示唆されている。実際、Ｔｈ２細胞が病態形成に重要な役割を担っていると考えられているアトピー性皮膚炎患者では末梢血中ＣＣＲ４陽性ＣＤ４陽性細胞の比率が高いこと（Ｊ．Ｌｅｕｋ．Ｂｉｏｌ．，６８，５６８（２０００））、皮膚病変部にＣＣＲ４陽性細胞が集積していること（Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１０７，３５３（２００１））が明らかにされている。さらには、アトピー型気管支喘息においても、ステロイドホルモン剤による治療に伴いＣＣＲ４陽性細胞の比率が低下すること（Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．，１６４，７５４（２００１））、抗原吸入後気道局所に浸潤しているＣＤ４陽性Ｔ細胞にはＣＣＲ４が発現されていること（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１０７，１３５７（２００１））等が報告されている。自己免疫疾患では、全身性エリテマトーデス患者において、活動期にＣＣＲ４陽性細胞が末梢血中に増加していることが報告されているが（Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ｂｉｏｌ．，７０，７４９（２００１））、間質性肺炎とＣＣＲ４陽性細胞との関連性、間質性肺炎とＴｈ２細胞との関連性に関しては明らかにされていない。

一般に、有用性の高い治療法を提供する為には、疾患の病態、成因に関しての深い理解が必要とされるが、上記の通り、特発性間質性肺炎、膠原病における間質性肺炎に関してはその成因等が殆ど解明されておらず、有効な治療方法の創出には至っていない。本疾患の治療はステロイドホルモン剤を用いることが基本とされており、その他にアザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリンといった免疫抑制剤が補助的に用いられているのみである。ステロイドホルモン剤は、長期の使用により骨粗鬆症、緑内障、白内障といった副作用を生じることは良く知られており、耐性を獲得する等の問題もある。また、免疫抑制剤も重篤な感染症を生じる可能性がある等を考慮すると必ずしも適切な治療方法とは考えられず、より安全で有効な治療薬の開発が必要とされている。

また、特発性間質性肺炎において、定型例と非定型例の炎症像の病理学的特徴を理解することは治療を考える上で重要であるが、有用な診断方法は示されていない。膠原病による間質性肺炎においても膠原病がもたらす各疾患（皮膚筋炎、慢性関節炎、リウマチなど）により肺病変の成因が異なるか否か等の基本的な解析が行われていない。喘息治療においても有効性と安全性の観点からより優れた治療薬の開発が求められており、それを可能にしているのは、喘息の病態解明である。即ち、病態の解明は治療法の開発にとって必要欠くべからざるものであると考えられ、特発性間質性肺炎、膠原病における間質性肺炎においてもその解明と診断方法の開発が必要とされている。

発明の開示

本発明の目的は、間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬、特に、定型例特発性間質性肺炎または膠原病における間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬、および定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別する診断薬を提供することにある。

さらに、本発明の目的は、定型例特発性間質性肺炎の非定型例特発性間質性肺炎との判別方法を提供することにある。

すなわち、本発明は以下の（１）～（５５）に関する。

（１）抗ＣＣＲ４抗体および／または抗ＸＣＲ３抗体を有効成分として含有する、間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬。

（２）間質性肺炎が、定型例特発性間質性肺炎または非定型例特発性間質性肺炎である、上記（１）記載の予防薬、診断薬または治療薬。

（３）間質性肺炎が、膠原病における間質性肺炎である、上記（１）記載の予防薬、診断薬または治療薬。

（４）抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体とを有効成分として含有する、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別する診断薬。

（５）抗ＣＣＲ４抗体が、ＣＣＲ４の細胞外領域に特異的に結合する抗体である、上記（

１）～（４）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（６）細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１～３９、９８～１１２、１７６～２０６および２７１～２８４番目からなる群から選ばれる細胞外領域である、上記（５）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（７）細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の２～２９番目に存在するエピトープである、上記（５）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（８）細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１３～２９番目に存在するエピトープである、上記（５）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（９）抗ＣＣＲ４抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはその抗体断片である、上記（１）～（８）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１０）抗ＣＣＲ４抗体が、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片である、上記（１）～（８）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１１）遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体およびその抗体断片から選ばれる抗体である、上記（１０）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１２）ヒト化抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）の相補性決定領域（ＣＤＲ）１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、上記（１１）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１３）ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相補性決定領域（ＣＤＲ）移植抗体およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、上記（１１）または（１２）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１４）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）と軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、および
ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）とＬ鎖Ｃ領域
を含む、上記（１３）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１５）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、上記（１３）または（１４）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１６）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（１３）～（１５）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１７）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、形質転換体ＫＭ２７６０（ＦＥＲＭ ＢＰ－７０５４）が生産する抗体ＫＭ２７６０またはその抗体断片である、上記（１３）～（１６）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１８）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲを含む、上記（１３）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（１９）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、および
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）
を含む、上記（１３）記載の予防薬、診断薬または治療薬。

（２０）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）、および
ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）およびＬ鎖Ｃ領域
を含む、上記（１３）記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２１）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、上記（１３）および（１８）～（２０）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２２）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０で示されるアミノ酸配列のうち、４０番目のＡｌａ、４２番目のＧｌｙ、４３番目のＬｙｓ、４４番目のＧｌｙ、７６番目のＬｙｓ、および９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、上記（１３）および（１８）～（２１）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２３）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１１で示されるアミノ酸配列のうち、２８番目のＴｈｒおよび９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、上記（１３）および（１８）～（２１）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２４）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０、１１、１３～１８から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２、１９～２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（１３）および（１８）～（２１）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２５）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１３で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（１３）および（１８）～（２１）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２６）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１４で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（１３）および（１８）～（２１）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。

（２７）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＦＥＲＭ　ＢＰ－８１２９およびＦＥＲＭ　ＢＰ－８１３０からなる群から選ばれる形質転換株から生産されるヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片である、上記（１３）および（１８）～（２１）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２８）抗体断片が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、２量体化可変領域（Ｖ領域）断片（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域断片（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる抗体断片である、上記（９）～（２７）のいずれか１項に記載の予防薬、診断薬または治療薬。
（２９）上記（９）～（２８）のいずれか１項に記載の抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合している、上記（９）～（２８）のいずれか１項の予防薬、診断薬または治療薬。
（３０）抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体を用いて試料中のＴｈ２細胞とＴｈ１細胞とを検出および／または定量することを特徴とする、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎との判別方法。
（３１）抗ＣＣＲ４抗体が、ＣＣＲ４の細胞外領域に特異的に結合する抗体である、上記（３０）記載の方法。
（３２）細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１～３９、９８～１１２、１７６～２０６および２７１～２８４番目からなる群から選ばれる細胞外領域である、上記（３１）記載の方法。
（３３）細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の２～２９番目に存在するエピトープである、上記（３１）記載の方法。
（３４）細胞外領域が、配列番号１で示されるアミノ酸配列の１３～２９番目に存在するエピトープである、上記（３１）記載の方法。
（３５）抗ＣＣＲ４抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはその抗体断片である、上記（３１）～（３４）のいずれか１項に記載の方法。
（３６）抗ＣＣＲ４抗体が、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片である、上記（３１）～（３４）のいずれか１項に記載の方法。
（３７）遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体およびその抗体断片から選ばれる抗体である、上記（３６）記載の方法。
（３８）ヒト化抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）の相補性決定領域（ＣＤＲ）１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、上記（３７）記載の方法。
（３９）ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相補性決定領域（ＣＤＲ）移植抗体およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、上記（３７）または（３８）記載の方法。
（４０）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）と軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、および
ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）とＬ鎖Ｃ領域
を含む、上記（３９）記載の方法。
（４１）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、上記（３９）または（４０）記載の方法。
（４２）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、

配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（３９）～（４１）のいずれか１項に記載の方法。
（４３）ヒト型キメラ抗体またはその抗体断片が、形質転換体ＫＭ２７６０（ＦＥＲＭ ＢＰ－７０５４）が生産する抗体ＫＭ２７６０またはその抗体断片である、上記（３９）～（４２）のいずれか１項に記載の方法。
（４４）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲを含む、上記（３９）記載の方法。
（４５）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、および
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）
を含む、上記（３９）記載の方法。
（４６）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
ＣＣＲ４に対するモノクローナル抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）および軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ、
ヒト抗体のＨ鎖Ｖ領域およびＬ鎖Ｖ領域のフレームワーク領域（ＦＲ）、および
ヒト抗体のＨ鎖定常領域（Ｃ領域）およびＬ鎖Ｃ領域
を含む、上記（３９）記載の方法。
（４７）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含む、上記（３９）および（４４）～（４６）のいずれか１項に記載の方法。
（４８）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０で示されるアミノ酸配列のうち、４０番目のＡｌａ、４２番目のＧｌｙ、４３番目のＬｙｓ、４４番目のＧｌｙ、７６番目のＬｙｓ、および９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、上記（３９）および（４４）～（４７）のいずれか１項に記載の方法。
（４９）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１１で示されるアミノ酸配列のうち、２８番目のＴｈｒおよび９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域、
を含む、上記（３９）および（４４）～（４７）のいずれか１項に記載の方法。
（５０）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１０、１１、１３～１８から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号１２、１９～２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（３９）および（４４）～（４７）のいずれか１項に記載の方法。
（５１）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、

配列番号１３から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（３９）および（４４）～（４７）のいずれか１項に記載の方法。
（５２）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、
配列番号１４から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）、および／または
配列番号２１から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域
を含む、上記（３９）および（４４）～（４７）のいずれか１項に記載の方法。
（５３）ヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片が、ＦＥＲＭ　ＢＰ－８１２９およびＦＥＲＭ　ＢＰ－８１３０からなる群から選ばれる形質転換株から生産されるヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片である、上記（３９）および（４４）～（４７）のいずれか１項に記載の方法。
（５４）抗体断片が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、２量体化可変領域（Ｖ領域）断片（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域断片（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる抗体断片である、上記（３５）～（５３）のいずれか１項に記載の方法。
（５５）上記（３５）～（５４）のいずれか１項に記載の抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合している、上記（３５）～（５４）のいずれか１項の方法。
以下、本発明を詳細に説明する。
間質性肺炎の発症は、ａ）膠原病による、ｂ）感染症による、ｃ）放射線に起因する、ｄ）職業または環境に起因する、ｅ）薬剤に起因する、ｆ）類肉腫症、好酸球肉芽腫、ＡＩＤＳなどに起因するなどが考えられるが、発生原因の特定できない間質性肺炎を特発性間質性肺炎という。
間質性肺炎のうち、特発性間質性肺炎としては、非定型特発性間質性肺炎、定型特発性間質性肺炎があげられる。
膠原病としては、皮膚筋炎、多発性筋炎、全身性硬化症（強皮症）、慢性関節リウマチなどがあげられる。
本発明で使用される抗ＣＣＲ４抗体としては、ＣＣＲ４に特異的に結合する抗体であればいかなるものでもよい。
予防薬または治療薬として使用する抗ＣＣＲ４抗体としては、ＣＣＲ４に特異的に結合し、ＣＣＲ４陽性細胞の機能を調節する、あるいは該抗体のエフェクター機能によりＣＣＲ４陽性細胞を生体内から排除することができるものであればいかなるものでもよい。具体的には、ＣＣＲ４の細胞外領域に結合し、抗体依存性細胞性細胞障害活性（ＡＤＣＣ活性）により、ＣＣＲ４発現細胞を傷害できる抗体およびその抗体断片等があげられる。
また、本発明で使用される抗ＣＸＣＲ３抗体としては、ＣＸＣＲ３に特異的に結合する抗体であればいかなるものでもよい。
予防薬または治療薬として使用する抗ＣＸＣＲ３抗体としては、ＣＸＣＲ３に特異的に結合し、ＣＸＣＲ３陽性細胞の機能を調節する、あるいは該抗体のエフェクター機能によりＣＸＣＲ３陽性細胞を生体内から排除することができるものであればいかなるものでもよい。具体的には、ＣＸＣＲ３の細胞外領域に結合し、抗体依存性細胞性細胞障害活性（ＡＤＣＣ活性）により、ＣＸＣＲ３発現細胞を傷害できる抗体およびその抗体断片等があげられる。
本発明で使用される抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、遺伝子組換え抗体またはそれらの抗体断片などいかなるものも包含される。
遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型ＣＤＲ移植抗体などのヒト化抗体があげられる。抗体断片としては、Ｆａｂ（ｆragment of antigen bindingの略）、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、一本鎖抗体（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ；以下、ｓｃＦｖと称す）、２量体化Ｖ領域断片（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスル

フィド安定化抗体（ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ Ｆｖ；以下、ｄｓＦｖと称す）およびＣＤＲを含むペプチド等があげられる。
抗ＣＸＣＲ３抗体は、ヒトＣＸＣＲ３の細胞外領域に特異的に反応するものが好ましい。
抗ＣＸＣＲ３抗体は、公知の手段（Ｈａｒｌｏｗ Ｅ．ａｎｄ Ｌａｎｅ Ｄ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）、以下、アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す）を用いて製造することができるが、市販の抗ＣＸＣＲ３抗体（ファーミンジェン社製）でもよいし、ＷＯ９８／１１２１８に開示された抗体でもよい。
抗ＣＣＲ４抗体は、ヒトＣＣＲ４の細胞外領域に特異的に反応するものが好ましく、具体的には、配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～３９、９８～１１２、１７６～２０６または２７１～２８４番目を含む領域に特異的に反応する抗体、より好ましくは配列番号１に示されるアミノ酸配列の２～２９番目（配列番号２２）に反応する抗体、さらに好ましくは配列番号１に示されるアミノ酸配列の１２～２９番目（配列番号２３）があげられる。
抗ＣＣＲ４抗体は、公知の手段（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル）を用いて製造することができる。
抗ＣＣＲ４抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。
本発明で使用されるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、ヒト化抗体およびこれらの抗体の抗体断片をあげることができる。
ハイブリドーマにより生産される抗ＣＣＲ４モノクローナル抗体は、具体的には以下に述べる方法によって製造することができる。
すなわち、ＣＣＲ４蛋白質を発現している細胞あるいはＣＣＲ４の部分配列に基づく合成ペプチドを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水よりＣＣＲ４に特異的に結合する抗体を分離、精製する。このようにして得られた抗ＣＣＲ４モノクローナル抗体として、ＷＯ０１／６４７５４に記載されているマウスＩｇＧ１サブクラスに属するハイブリドーマＫＭ２１６０が生産するモノクローナル抗体ＫＭ２１６０があげられる（Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１１，８１（１９９９））。
さらに、抗ＣＣＲ４抗体としては、ヒト化抗体等の遺伝子組換え抗体、およびその抗体断片があげられる。
本発明で使用されるヒト化抗体としては、上記の抗ＣＣＲ４モノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変した遺伝子組換え抗体およびその抗体断片があげられる。該抗体においては、抗原性が低く、血中半減期の延長されたものが、予防薬または治療薬として好ましい。
ヒト化抗体として、好ましくは、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（Ｈ鎖）可変領域（Ｖ領域）の相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ；以下、ＣＤＲと略記する）１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（Ｌ鎖）Ｖ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含むヒト化抗体またはその抗体断片があげられる（ＷＯ０１／６４７５４）。
さらに、ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型ＣＤＲ移植抗体およびそれらの抗体断片があげられる。
ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域（以下、重鎖をＨ鎖、可変領域をＶ領域、Ｈ鎖Ｖ領域をＶＨとも称す）および軽鎖Ｖ領域（以下、軽鎖をＬ鎖、Ｌ鎖Ｖ領域をＶＬとも称す）とヒト抗体のＨ鎖定常領域（以下、定常領域をＣ領域、Ｈ鎖Ｃ領域

をＣＨとも称す）およびヒト抗体のＬ鎖Ｃ領域（以下、ＣＬとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。
本発明で使用されるヒト型キメラ抗体は、抗ＣＣＲ４抗体を生産するハイブリドーマより、ＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。
ヒト型キメラ抗体のＣＨとしては、ヒトイムノグロブリン（ｈＩｇ）に属すればいかなるものでもよいが、ｈＩｇＧクラスのものが好適であり、ｈＩｇＧクラスに属するγ１、γ２、γ３、γ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のＣＬとしては、ｈＩｇに属すればいずれのものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。
ＣＣＲ４に特異的に結合するヒト型キメラ抗体（以下、抗ＣＣＲ４キメラ抗体とも称する）として、好ましくは
配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなるＶＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなるＶＬのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３を含むヒト型キメラ抗体またはその抗体断片があげられる。
さらに好ましくは、
配列番号８で示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および／または
配列番号９で示されるアミノ酸配列を含むＶＬ
を含むヒト型キメラ抗体またはその抗体断片があげられる（ＷＯ０１／６４７５４）。
具体的には、抗体のＶＨが配列番号８記載のアミノ酸配列、ＣＨがヒトγ１サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体のＶＬが配列番号９記載のアミノ酸配列、ＣＬがヒトκクラスのアミノ酸配列からなるＷＯ０１／６４７５４に開示されているヒト型キメラ抗体ＫＭ２７６０またはその抗体断片があげられる。
ヒト型キメラ抗体ＫＭ２７６０を生産する形質転換体ＫＭ２７６０は、通商産業省　工業技術院生命工学工業技術研究所（現名称：独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号（現住所：日本国茨城県つくば市東１－１－１中央第６））に平成１２年２月２４日付けでＦＥＲＭ　ＢＰ－７０５４として国際寄託されている（ＷＯ０１／６４７５４）。
ヒト型ＣＤＲ移植抗体は、ヒト抗体に、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをヒト以外の動物の抗体のＣＤＲ配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。
本発明で使用されるヒト型ＣＤＲ移植抗体は、ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲ配列で任意のヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲ配列をそれぞれ置換したＶ領域をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびヒト抗体のＣＬをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。
ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＣＨとしては、ｈＩｇに属すればいかなるものでもよいが、ｈＩｇＧクラスのものが好適であり、さらにｈＩｇＧクラスに属するγ１、γ２、γ３、γ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＣＬとしては、ｈＩｇに属すればいずれのものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。
ＣＣＲ４に特異的に結合するヒト型ＣＤＲ移植抗体（以下、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体とも称する）としては、好ましくは、
それぞれ配列番号２、３、４で示されるアミノ酸配列からなるＶＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、および／または
それぞれ配列番号５、６、７で示されるアミノ酸配列からなるＶＬのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３
を含むヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片があげられる。

より好ましくは、
配列番号１０または１１で示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および／または　配列番号１２で示されるアミノ酸配列を含むＶＬ
を含むヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片があげられる。
さらに好ましくは、
配列番号１０で示されるアミノ酸配列のうち、４０番目のＡｌａ、４２番目のＧｌｙ、４３番目のＬｙｓ、４４番目のＧｌｙ、７６番目のＬｙｓ、および９７番目のＡｌａから選ばれる少なくとも１つアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ
を含むヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片、または
配列番号１１で示されるアミノ酸配列のうち、２８番目のＴｈｒおよび９７番目のＡｌａのうち少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ、および／または
配列番号１２で示されるアミノ酸配列のうち、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ
を含むヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片があげられる。
具体的には、
配列番号１３～１８から選ばれるアミノ酸配列を含むＶＨ、および／または
配列番号１９～２１から選ばれるアミノ酸配列を含むＶＬ
を含むヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片があげられる。
さらに具体的には、
配列番号１３に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および／または
配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ
を含むヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片、
配列番号１４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および／または
配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ
を含むヒト型ＣＤＲ移植抗体またはその抗体断片があげられる。
配列番号１３に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶＬを含むＣＣＲ４に反応するヒト型ＣＤＲ移植抗体ＫＭ８７５９を生産する形質転換体ＫＭ８７５９は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１４年７月３０日付けでＦＥＲＭ　ＢＰ－８１２９として国際寄託されている。
配列番号１４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ、配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含むＶＬを含むＣＣＲ４に反応するヒト型ＣＤＲ移植抗体ＫＭ８７６０を生産する形質転換体ＫＭ８７６０は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１４年７月３０日付けでＦＥＲＭ　ＢＰ－８１３０として国際寄託されている。
本発明で使用される抗ＣＣＲ４抗体を規定するアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加され、かつＣＣＲ４と特異的に反応する抗体またはその抗体断片も本発明の範囲に包含される。
本発明のアミノ酸配列において１以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ１もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、１または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてもよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、Ｌ－アラニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－グルタミン、Ｌ－グルタミン酸、グリシン、Ｌ－ヒスチ

ジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、Ｌ－システイン等があげられる。
以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。
Ａ群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、２－アミノブタン酸、メチオニン、Ｏ－メチルセリン、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン
Ｂ群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、２－アミノアジピン酸、２－アミノスベリン酸
Ｃ群：アスパラギン、グルタミン
Ｄ群：リジン、アルギニン、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸
Ｅ群：プロリン、３－ヒドロキシプロリン、４－ヒドロキシプロリン
Ｆ群：セリン、スレオニン、ホモセリン
Ｇ群：フェニルアラニン、チロシン
本発明で使用される抗ＣＣＲ４抗体には、抗体断片も含まれる。抗体断片として、ＣＣＲ４に特異的に結合する抗体断片であるＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、Ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖおよびＣＤＲを含むペプチド等があげられる。
Ｆａｂは、ＩｇＧを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２２４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｈ鎖のＮ末端側約半分とＬ鎖全体がジスルフィド結合（Ｓ－Ｓ結合）で結合した分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。
本発明のＦａｂは、抗ＣＣＲ４抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のＦａｂをコードするＤＮＡを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Ｆａｂを製造することができる。
Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２３４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｆａｂがヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約１０万の抗原結合活性を有する抗体断片である。
本発明のＦ（ａｂ’）$_2$は、抗ＣＣＲ４抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のＦａｂ’をチオエーテル結合あるいはＳ－Ｓ結合させ、作製することができる。
Ｆａｂ’は、上記Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を切断した分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。
本発明のＦａｂ’は、上記Ｆ（ａｂ’）$_2$を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、抗ＣＣＲ４抗体のＦａｂ’をコードするＤＮＡを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。
ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを１２残基以上の適当なペプチドリンカー（Ｐ）を用いて連結した、ＶＨ－Ｐ－ＶＬないしはＶＬ－Ｐ－ＶＨポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。
本発明のｓｃＦｖは、抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。
Ｄｉａｂｏｄｙは、抗原結合特異性の同じまたは異なるｓｃＦｖが２量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する２価の抗原結合活性または異なる抗原に対する２特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。
本発明のＤｉａｂｏｄｙ、例えば、ＣＣＲ４に特異的に反応する２価のＤｉａｂｏｄｙは

、抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、３～１０残基のポリペプチドリンカーを有するｓｃＦｖをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することによりＤｉａｂｏｄｙを発現させ、製造することができる。ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のＳ－Ｓ結合を介して結合抗体断片である。システイン残基に置換するアミノ酸残基はＲｅｉｔｅｒらにより示された方法（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７，６９７（１９９４））に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明のｄｓＦｖは、抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｄｓＦｖをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域以上を含んで構成される抗体断片である。複数のＣＤＲを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

本発明のＣＤＲを含むペプチドは、抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするｃＤＮＡを構築し、該ｃＤＮＡを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、ｔＢｏｃ法（ｔ－ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗ＣＣＲ４抗体は、本発明の抗ＣＣＲ４抗体に放射性同位元素、蛋白質または薬剤などを化学的にあるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の抗ＣＣＲ４抗体の誘導体は、抗ＣＣＲ４抗体またはその抗体断片のＨ鎖あるいはＬ鎖のＮ末端側あるいはＣ末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは薬剤などを化学的手法（抗体工学入門、金光修著、（株）地人書館（１９９４））により結合させることにより製造することができる。

または、抗ＣＣＲ４抗体またはその抗体断片をコードするＤＮＡと、結合させたい蛋白質をコードするＤＮＡを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

放射性同位元素としては、^{131}Ｉ、^{125}Ｉ等があげられ、例えば、クロラミンＴ法等により、抗体に結合させることができる。

薬剤としては、低分子のものが好ましく、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、５－フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンＣ、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタソンなどのホルモン剤等の抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社（１９９６））、またはハイドロコーチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（１９８２））などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタールアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン２（ｈＩＬ－２）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ｈＧＭ

－ＣＳＦ）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（ｈＭ－ＣＳＦ）、ヒトインターロイキン１２（ｈＩＬ－１２）等があげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体ついては、抗体または抗体断片をコードするｃＤＮＡに蛋白質をコードするｃＤＮＡを連結させ、融合抗体をコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

以下に、本発明で使用される抗ＣＣＲ４抗体の具体的な作製方法と活性評価方法、抗ＣＣＲ４抗体を含有する間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬、抗ＣＣＲ４抗体を用いた特発性間質性肺炎の判定方法について説明する。

１．抗ＣＣＲ４抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）の作製方法

（１）抗原の調製

抗ＣＣＲ４抗体を作製するために必要な抗原としては、ＣＣＲ４を発現する細胞あるいはその細胞画分、またはＣＣＲ４、ＣＣＲ４の部分断片、ＣＣＲ４のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチド等があげられる。

ＣＣＲ４およびＣＣＲ４の部分断片は、ＣＣＲ４をコードする全長あるいはその部分断片ｃＤＮＡ（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ，２７０，１９４９５（１９９５））を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたＣＣＲ４発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは細胞表面にそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。また、ＣＣＲ４の部分配列を有するペプチドは、アミノ酸合成機を用いて調製することができる。

ＣＣＲ４をコードする全長あるいはその部分断片ｃＤＮＡは、ＣＣＲ４を発現しているヒト末梢血等の細胞から調製したｃＤＮＡを鋳型にした、ポリメラーゼ連鎖反応（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ、以下ＰＣＲと記す；Ｓａｍｂｒｏｏｋ Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（２００１）（以下、「モレキュラー・クローニング第３版」と記す）、Ａｕｓｕｂｅｌ Ｆ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（１９８７－２００１）（以下、「カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」と記す））により調製することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、バチルス・ズブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ（Ｎａｍａｌｗａ）細胞、サルの細胞であるＣＯＳ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるＣＨＯ細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Ｓｆ９、Ｓｆ２１（ファーミンジェン（Ｆａｒｍｉｎｇｅｎ）社製）、Ｈｉｇｈ Ｆｉｖｅ（インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）社製）等が例示される。

ＣＣＲ４をコードする全長あるいはその部分断片ｃＤＮＡを導入するベクターとしては、該ＤＮＡを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、ＣＣＲ４をコードする全長あるいはその部分断片ｃＤＮＡ、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のｐＧＥＸ－２Ｔ（アマシャム・バイオサイエンス（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）社製）、ｐＥＴ１７ｂ（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ）社製）等が例示される。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にＤＮＡを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法（Ｃｏｈｅｎ Ｓ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，６９，２１１０－２１１４（１９７２））、プロトプラスト法（特開昭６３－２４８３９４）等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、ＹＥｐ１３（ＡＴＣＣ３７１１５）、ＹＥｐ２４（ＡＴＣＣ３７０５１）、ＹＣｐ５０（ＡＴＣＣ３７４１９）等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にＤＮＡを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法（Ｂｅｃｋｅｒ Ｄ．Ｍ．ａｎｄ Ｇｕａｒｅｎｔｅ Ｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１９４，１８２－１８７（１９９１））、スフェロプラスト法（Ｈｉｎｎｅｎ Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，１９２９－１９３３（１９７８））、酢酸リチウム法（Ｉｔｏ Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５３，１６３－１６８（１９８３））等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、ｐＡＧＥ１０７（特開平３－２２９７９；Ｍｉｙａｊｉ Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３－１４０（１９９０））、ｐＡＧＥ１０３（Ｍｉｚｕｋａｍｉ Ｔ．ａｎｄ Ｉｔｏｈ Ｓ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０１，１３０７－１３１０（１９８７））等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウィルス（ＣＭＶ）のＩＥ（ｉｍｍｅｄｉａｔｅ ｅａｒｌｙ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法（Ｍｉｙａｊｉ Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３－１４０（１９９０））、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５）、リポフェクション法（Ｆｅｌｇｎｅｒ Ｐ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３－７４１７（１９８７））等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９４）等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３（共にファーミンジェン社製）、ｐＢｌｕｅＢａｃ４．５（インビトロジェン社製）等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ ｎｕｃｌｅａｒ ｐｏｌｙｈｅｄｒｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ）等が用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５）、リポフェクション法（Ｆｅｌｇｎｅｒ Ｐ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３－７４１７（１９８７））等が用いられる。

また、ファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキット等を用いて組換えバキュ

ロウィルスを作製したのち、前述したＳｆ９、Ｓｆ２１あるいはＨｉｇｈ　Ｆｉｖｅ等の昆虫細胞に該組換えウィルスを感染させることによりＣＣＲ４を生産させることもできる（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，６，４７（１９８８））。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、該培養物からＣＣＲ４を採取することにより、ＣＣＲ４の全長あるいはその部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい（モレキュラー・クローニング第３版）。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下、１５～４０℃で１６～９６時間行う。培養期間中、ｐＨは３．０～９．０に保持する。ｐＨの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常５％CO_2存在下、３５～３７℃で３～７日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているＴＮＭ－ＦＨ培地（ファーミンジェン社製）、Ｓｆ９００ＩＩＳＦＭ（インビトロジェン社製）、ＥｘＣｅｌｌ４００、ＥｘＣｅｌｌ４０５（いずれもＪＲＨバイオサイエンシズ（ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）社製）等が用いられる。培養は、２５～３０℃で１～４日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、ＣＣＲ４の部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

ＣＣＲ４の全長あるいはその部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法等により細胞を破砕し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

ＣＣＲ４あるいはその部分断片、あるいはこれらの融合蛋白質が細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。

単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動等の分離操作を単独あるいは組合わせて行うことができる。

ＣＣＲ４のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドは、Ｆｍｏｃ法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、ｔＢｏｃ法（ｔ－ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＣｈｅｍＴｅｃｈ）社、アプライド・バイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）社、プロテイン・テクノロジーズ（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）社、島津製作所等のペプチド合成機を用いても製造することができる。

（２）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として動物を免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を抗原に結合させて投与する、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

キャリアタンパク質としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン（Ｋｅｙｈｏｌｅ ｌｉｍｐｅｔ ｈｅｍｏｃｙａｎｉｎ）、ウシ血清アルブミン、ウシチログロブリン等があげられ、アジュバンドとしては、フロイントの完全アジュバント（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ Ａｄｊｕｖａｎｔ）、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスター等の非ヒト哺乳動物があげられる。

抗原の投与は、１回目の投与の後、１～２週間毎に３～１０回行う。抗原の投与量は動物１匹当たり５０～１００μｇが好ましい。各投与後、３～７日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との特異的な結合性について、下記に示すような酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ；酵素免疫測定法第３版医学書院（１９８７）、アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル，Ｃｈａｐｔｅｒ １４、Ｇｏｄｉｎｇ Ｊ．Ｗ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６））等で確認する。

酵素免疫測定法は以下のようにして行うことができる。

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞等をプレートにコートし免疫動物より採取した血清を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。反応後、第二抗体を標識した物質に応じた検出反応を行い、抗体価を測定する。

第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体を、パーオキシダーゼ等の酵素やビオチン等で標識したものである。具体的には、免疫動物にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

抗原の最終投与後３～７日目に、免疫動物より公知の方法（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル）に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髄腫細胞とを融合させる。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物脾細胞、リンパ節、末梢血等から採取する。

（３）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）骨髄腫細胞株Ｐ３－Ｘ６３Ａｇ８－Ｕ１（Ｋｏｈｌｅｒ Ｇ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ Ｃ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６，５１１－５１９（１９７６））、ＳＰ２／Ｏ－Ａｇ１４（Ｓｈｕｌｍａｎ Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２７６，２６９－２７０（１９７８））、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８６５３（Ｋｅａｒｎｅｙ Ｊ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２３，１５４８－１５５０（１９７９））、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８（Ｋｏｈｌｅｒ Ｇ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ Ｃ，Ｎａｔｕｒｅ，２５６，４９５－４９７（１９７５））等、イン・ビトロ（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）で増殖可能な骨髄腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル）に従い、細胞融合時までに2×10^{7}個以上の細胞数を確保する。

（４）細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングリコール－１０００（ＰＥＧ－１０００）等の細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはＭＥＭ培地またはＰＢＳ（リン酸二ナトリウム１．８３ｇ、リン酸一カリウム０．２１ｇ、塩化ナトリウム７．６５ｇ、蒸留水１Ｌ、ＰＨ７．２）等を用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、ＨＡＴ培地［正常培地（１．５ｍｍｏｌ／Ｌグルタミン、5×10^{-5}ｍｏｌ／Ｌ　２－メルカプトエタノール、１０ｇ／ｍＬゲンタマイシンおよび１０％ウシ胎児血清を加えたＲＰＭＩ１６４０培地）に10^{-4}ｍｏｌ／Ｌヒポキサンチン、1.5×10^{-5}ｍｏｌ／Ｌチミジンおよび4×10^{-7}ｍｏｌ／Ｌアミノプテリンを加えた培地］を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、下記の酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをＣＣＲ４と特異的に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

酵素免疫測定法は１．（２）に記載したのと同様に行うが、第一抗体として、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の方法で得られる精製抗体を用いる。

モノクローナル抗体とＣＣＲ４との特異的な結合は表面プラズモン共鳴（Ｋａｒｌｓｓｏｎ　Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１４５，２２９－２４０（１９９１））によっても評価できる。

抗ＣＣＲ４モノクローナル抗体の具体例としては、上記記載のハイブリドーマＫＭ２１６０が生産するモノクローナル抗体ＫＭ２１６０があげられる。

（５）モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン（Ｐｒｉｓｔａｎｅ）処理〔プリスタン（２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン）０．５ｍＬを腹腔内投与し、２週間飼育する〕した８～１０週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、４０～５０％飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、ＤＥＡＥ－セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインＡまたはＧ－カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組合わせて行う方法があげられる。この方法により、ＩｇＧあるいはＩｇＭ画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキット等を用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは２８０ｎｍでの吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ヒトでは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４があげられるが、特にマウスＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ヒトＩｇＧ１タイプは、補体依存性細胞傷害活性（以下、ＣＤＣ活性と称す）およびＡＤＣＣ活性を有し、治療への応用上、有用である。

具体的には、ＷＯ０１／６４７５４に記載の方法に従って、抗ＣＣＲ４抗体を作製することができる。

２．抗ＣＣＲ４ヒト化抗体の作製方法

（１）ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のＣ領域であるＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築することができる。

ヒト抗体のＣ領域は任意のヒト抗体のＣＨおよびＣＬであることができ、例えば、ヒト抗

体γ１サブクラスのＣＨ、γ４サブクラスのＣＨ、およびκクラスのＣＬ等があげられる。ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡとしてはエキソンとイントロンより成る染色体ＤＮＡを用いることができ、また、ｃＤＮＡを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体Ｃ領域をコードする遺伝子を組込み、発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

例えば、ｐＡＧＥ１０７（特開平３－２２９７９；Ｍｉｙａｊｉ Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３－１４０（１９９０））、ｐＡＧＥ１０３（Ｍｉｚｕｋａｍｉ Ｔ．ａｎｄ Ｉｔｏｈ Ｓ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０１，１３０７－１３１０（１９８７））、ｐＨＳＧ２７４（Ｂｒａｄｙ Ｇ．ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，２７，２２３－２３２（１９８４））、ｐＫＣＲ（Ｏ’Ｈａｒｅ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，７８，１５２７－１５３１（１９８１））、ｐＳＧ１ β ｄ２－４（Ｍｉｙａｊｉ Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，４，１７３－１８０（１９９０））等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、ＳＶ４０の初期プロモーターとエンハンサー（Ｍｉｚｕｋａｍｉ Ｔ．ａｎｄ Ｉｔｏｈ Ｓ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０１，１３０７－１３１０（１９８７））、モロニーマウス白血病ウイルスのＬＴＲプロモーターとエンハンサー（Ｋｕｗａｎａ Ｙ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１４３，９６０－９６８（１９８７））、および免疫グロブリンＨ鎖のプロモーター（Ｍａｓｏｎ Ｊ．Ｏ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，４１，４７９－４８７（１９８５））とエンハンサー（Ｇｉｌｌｉｅｓ Ｓ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，３３，７１７－７２８（１９８３））等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体Ｈ鎖、Ｌ鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体Ｈ鎖およびＬ鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい（Ｓｈｉｔａｒａ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６７，２７１－２７８（１９９４））。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、ｐＫＡＮＴＥＸ９３（ＷＯ９７／１０３５４）、ｐＥＥ１８（Ｂｅｎｔｌｅｙ Ｋ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ，１７．，５５９－５６７（１９９８））等があげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型ＣＤＲ移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

（２）ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡの取得

ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体、例えば、マウス抗ＣＣＲ４モノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡは以下のようにして取得する。

マウス抗ＣＣＲ４モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウス抗ＣＣＲ４抗体産生ハイブリドーマ等よりｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。合成したｃＤＮＡを、ファージあるいはプラスミド等のベクターに挿入し、ｃＤＮＡライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のＣ領域部分あるいはＶ領域部分をプローブとして用い、ＶＨをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびＶＬをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上のＶＨおよびＶＬの全塩基配列を決定し、塩基配列よりＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマから全ＲＮＡを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法（Ｏｋａｙａｍａ Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５４，３－２８（１９８７））、また、全ＲＮＡからｍＲＮＡを調製する方法としては、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第３版）等があげられる。また、ハイブリドーマからｍＲＮＡを調製するキットとしては、

ファストトラック（ＦａｓｔＴｒａｃｋ）ｍＲＮＡ単離キット（インビトロジェン社製）、クイックプレップ（ＱｕｉｃｋＰｒｅｐ）ｍＲＮＡ精製キット（アマシャム・バイオサイエンシズ社製）等があげられる。

ｃＤＮＡの合成およびｃＤＮＡライブラリー作製法としては、常法（モレキュラー・クローニング第３版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー）、あるいは市販のキット、例えば、ｃＤＮＡ合成用スーパースクリプト・チョイス・システム（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ Ｃｈｏｉｃｅ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、インビトロジェン社製）やＺＡＰ－ｃＤＮＡ合成キット〔ストラタジーン（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ）社製〕、タイムセーバー（ＴｉｍｅＳａｖｅｒ）ｃＤＮＡ合成キット（アマシャム・バイオサイエンシズ社製）を用いる方法等があげられる。

ｃＤＮＡライブラリーの作製の際、ハイブリドーマから抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターは、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ（ストラタジーン社製）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋）（ストラタジーン社製）、λＺＡＰ ＩＩ（ストラタジーン社製）、λｇｔ１０（ストラタジーン社製）、λｇｔ１１ストラタジーン社製）、Ｌａｍｂｄａ ＢｌｕｅＭｉｄ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）、λＥｘＣｅｌｌ（アマシャム・バイオサイエンシズ社製）、ｐｃＤ２（Ｏｋａｙａｍａ Ｈ．ａｎｄ Ｂｅｒｇ Ｐ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，３，２８０－２８９（１９８３））およびｐＵＣ１８（Ｙａｎｉｓｃｈ－Ｐｅｒｒｏｎ Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，３３，１０３－１１９（１９８５））等のファージあるいはプラスミドベクターが用いられる。

ファージあるいはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌としては該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’（ストラタジーン社製）、Ｃ６００（Ａｐｐｌｅｙａｒｄ Ｒ．Ｋ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，３９，４４０－４５２（１９５４））、Ｙ１０８８（Ｙｏｕｎｇ Ｒ．Ａ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ Ｒ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２２，７７８－７８２（１９８３））、Ｙ１０９０（Ｙｏｕｎｇ Ｒ．Ａ．ａｎｄ Ｄａｖｉｓ Ｒ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２２，７７８－７８２（１９８３））、ＮＭ５２２（Ｇｏｕｇｈ Ｊ．Ａ．ａｎｄ Ｍｕｒｒａｙ Ｎ．Ｅ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６６，１－１９（１９８３））、Ｋ８０２（Ｗｏｏｄ Ｗ．Ｂ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６，１１８－１３３（１９６６））およびＪＭ１０５（Ｙａｎｉｓｃｈ－Ｐｅｒｒｏｎ Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，３３，１０３－１１９（１８５））等が用いられる。

ｃＤＮＡライブラリーからのヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡクローンの選択法としては、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはプラーク・ハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第３版）により選択することができる。また、プライマーを調製し、ｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡあるいはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、ＰＣＲによりＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

上記方法により選択されたｃＤＮＡの塩基配列は、適当なベクターにクローニングされた該ｃＤＮＡを用いてジデオキシ法（Ｓａｎｇｅｒ Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７４，５４６３－５４６７（１９７７））に基く反応を行い、ＡＢＩ３７７（アプライドバイオシステムズ社製）等のＤＮＡシークエンサーを用いて解析することで決定することができる。

（３）ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列の解析とＣＤＲのアミノ酸配列の同定

２．（２）で取得し、決定したｃＤＮＡの塩基配列から該ｃＤＮＡがコードするＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）、以下、「シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・イン

タレスト」と記す）と比較することにより、取得したｃＤＮＡが分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびＮ末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属するサブグループを知ることができる。

さらに、任意のデータベース、例えばＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴやＰＩＲ－Ｐｒｏｔｅｉｎ等に対して、ＢＬＡＳＴ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ Ｓ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５，４０３－４１０（１９９０））等相同性検索プログラムを用いて、得られたＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

抗体の抗原結合部位を形成するＶＨ及びＶＬは、配列の比較的保存された４個のフレームワーク領域（以下、ＦＲと称す）とそれらを連結する配列の変化に富んだ３個のＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）からなる（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）。そしてＶＨおよびＶＬの各ＣＤＲのアミノ酸配列は、既知の抗体のＶ領域のアミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することにより同定することができる

（４）抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクターの構築

２．（１）で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子の上流に、ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを挿入し、抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを有するプラスミドを鋳型として、抗体のＶＨおよびＶＬを、適当な制限酵素の認識配列とＶ領域をコードする塩基配列よりなる５’末端側と３’末端側のプライマーを用いてＰＣＲ法により増幅し、それぞれの増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）等のプラスミドにクローニングし、２．（２）に記載の方法により、塩基配列を決定し、抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を有するプラスミドを取得する。得られたプラスミドより、抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを単離し、２．（１）に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

（５）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの構築

抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡは、以下の様にして構築することができる。まず、ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ等のデータベースに登録されているヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）等があげられるが、それらの中でも、十分な活性を有するヒト型ＣＤＲ移植抗体を作製するためには、ヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性、好ましくは６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗ＣＣＲ４抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植し、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮して塩基配列に変換し、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配

列に基づき、１００塩基前後の長さからなる数本の合成ＤＮＡを合成し、それらを用いてＰＣＲ法を行う。この場合、ＰＣＲでの反応効率および合成可能なＤＮＡの長さから、ＶＨ、ＶＬとも６本の合成ＤＮＡを設計することが好ましい。また、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、２．（１）で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。ＰＣＲ反応後、増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）等のプラスミドベクターにクローニングし、２．（２）に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望の抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

（６）ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列の改変

ヒト型ＣＤＲ移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのみをヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲに、移植しただけでは、その抗原結合活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている（Ｔｅｍｐｅｓｔ　Ｐ．Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９，２６６－２７１（１９９１））。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬでは、ＣＤＲのみならず、ＦＲのいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がＣＤＲの移植に伴い、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型ＣＤＲ移植抗体では、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基やＣＤＲのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている（Ｔｅｍｐｅｓｔ　Ｐ．Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９，２６６－２７１（１９９１））。ヒト型ＣＤＲ移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるＦＲのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにＸ線結晶解析（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ　Ｆ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１１２，５３５－５４２（１９７７））あるいはコンピューターモデリング（Ｔｅｍｐｅｓｔ　Ｐ．Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７，１５０１－１５０７（１９９４））等による抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型ＣＤＲ移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型ＣＤＲ移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸残基の改変は、改変用合成ＤＮＡをプライマーとして用いてＰＣＲ法を行うことにより、達成できる。ＰＣＲ後の増幅産物について２．（２）に記載の方法により、その塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認して、目的の変異が導入されたｃＤＮＡを含むベクター（以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す）を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、２０～３５塩基からなる変異導入プライマーを用いたＰＣＲ変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列を含む２０～３５塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを含むプラスミドを鋳型として２段階のＰＣＲを行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたｃＤＮＡを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

（７）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクターの構築

２．（１）に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡの上流に、２．（５）および（６）で構築した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡをクローニングし、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクタ

ーを構築することができる。例えば、２．（５）および（６）で抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬを構築する際に用いる合成ＤＮＡのうち、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、２．（１）に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡの上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングすることができる。

（８）ヒト化抗体の一過性発現および活性評価

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、２．（４）記載の抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクター、２．（７）に記載の抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、ＣＯＳ－７細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１６５１）が一般に用いられる（Ｗａｒｒ Ｇ．Ｗ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ＣＲＣ ｐｒｅｓｓ，２８３（１９９０））。ＣＯＳ－７細胞への発現ベクターの導入法としては、ＤＥＡＥ－デキストラン法（Ｗａｒｒ Ｇ．Ｗ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ＣＲＣ ｐｒｅｓｓ，２８３（１９９０））、リポフェクション法（Ｆｅｌｇｎｅｒ Ｐ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３－７４１７（１９８７））等があげられる。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は、第一抗体として培養上清を、第二抗体として標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた１．（２）に記載の酵素免疫測定法等により測定できる。

（９）ヒト化抗体の安定発現および活性評価

２．（４）記載の抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクターまたは２．（７）に記載の抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法（特開平２－２５７８９１；Ｍｉｙａｊｉ Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３－１４０（１９９０））等があげられる。

抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクターまたは抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスＳＰ２／Ｏ－Ａｇ１４細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１５８１）、マウスＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１５８０）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、ＤＨＦＲ遺伝子と称す）が欠損したＣＨＯ細胞（Ｕｒｌａｕｂ Ｇ．ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ Ｌ．Ａ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７，４２１６－４２２０ １９８０）、ラットＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１６６２、以下、ＹＢ２／Ｏ細胞と称す）等があげられる。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換体は、Ｇ４１８（Ｇ４１８ ｓｕｌｆａｔｅ；シグマ・アルドリッチ社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる（Ｓｈｉｔａｒａ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６７，２７１－２７８（１９９４））。動物細胞培養用培地としては、ＲＰＭＩ１６４０培地（日水製薬社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地（ＪＲＨバイオサイエンシズ社製）、ＩＭＤＭ培地（インビトロジェン社製）、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にウシ胎児血清（ＦＢＳ）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換体を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は前記１．（４）に記載のＥＬＩＳＡ等により測定できる。また、形質転換体は、ＤＨＦＲ遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる（Ｓｈｉｔａｒａ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，

Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６７，２７１－２７８（１９９４））。
ヒト化抗体は、形質転換体の培養上清よりプロテインＡカラムを用いて精製することができる（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル，Ｃｈａｐｔｅｒ　８；Ｇｏｄｉｎｇ　Ｊ．Ｗ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のＨ鎖、Ｌ鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；ｌａｅｍｍｌｉ　Ｕ．Ｋ．，Ｎａｔｕｒｅ，２２７，６８０－６８５（１９７０））やウエスタンブロッティング法（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル，Ｃｈａｐｔｅｒ　１２；Ｇｏｄｉｎｇ　Ｊ．Ｗ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６））等で測定する。
精製したヒト化抗体の抗原結合活性は、第一抗体として精製ヒト化抗体を、第二抗体として標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた前記１．（２）に記載の酵素免疫測定法、及び蛍光抗体法（Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３））、ＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}等を用いた表面プラズモン共鳴（Ｋａｒｌｓｓｏｎ　Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１４５，２２９－２４０（１９９１））等により測定できる。抗原陽性培養細胞に対する細胞障害活性は、ＣＤＣ活性、ＡＤＣＣ活性等を測定し、評価することができる（Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３））。産生サイトカイン量の変化はＥＬＩＳＡ法及び蛍光抗体法等により測定できる。
具体的には、ＷＯ０１／６４７５４に記載の方法に従って、抗ＣＣＲ４キメラ抗体を作製することができる。また、後述する参考例に記載の方法に従って、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体を作製することができる。
３．抗体断片の作製
抗体断片は、１．および２．に記載の抗ＣＣＲ４モノクローナル抗体、抗ＣＣＲ４ヒト化抗体を元に遺伝子工学的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、Ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖ、ＣＤＲを含むペプチド等があげられる。
（１）Ｆａｂの作製
Ｆａｂは、抗ＣＣＲ４抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテインＡ結合性を有するＩｇＧサブクラスであれば、プロテインＡカラムに通すことで、ＩｇＧ分子やＦｃ断片と分離し、均一なＦａｂとして回収することができる（Ｇｏｄｉｎｇ　Ｊ．Ｗ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。プロテインＡ結合性を持たないＩｇＧサブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Ｆａｂは低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる（Ｇｏｄｉｎｇ　Ｊ．Ｗ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。また、Ｆａｂは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、２．（２）、（５）および（６）に記載の抗体のＶ領域をコードするＤＮＡを、Ｆａｂ発現用ベクターにクローニングし、Ｆａｂ発現ベクターを作製することができる。Ｆａｂ発現用ベクターとしては、Ｆａｂ用のＤＮＡを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、ｐＩＴ１０６（Ｂｅｔｔｅｒ　Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０，１０４１－１０４３（１９８８））等があげられる。Ｆａｂ発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にＦａｂを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるＦａｂとすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、培養上清中に活性を持ったＦａｂが漏出する。リフォールディング後

あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一なＦａｂを精製することができる（Ｂｏｒｒｅｂｅｃｋ Ｋ.，Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９１））。

（２）Ｆ（ａｂ’）$_2$の作製

Ｆ（ａｂ’）$_2$は、抗ＣＣＲ４抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Ｆａｂと同様の精製操作により、均一なＦ（ａｂ’）$_2$として回収することができる（Ｇｏｄｉｎｇ Ｊ.Ｗ.，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。また、３.（３）に記載のＦａｂ’をＮ，Ｎ’－ｏ－フェニレンジマレイミドやビスマレイミドヘキサン等のようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、５、５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ）で処理し、ジスルフィド結合させる方法によっても作製することができる（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ Ｊ.ｅｔ ａｌ.，Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。

（３）Ｆａｂ’の作製

Ｆａｂ’は、３.（２）に記載のＦ（ａｂ’）$_2$をジチオスレイトール等の還元剤で処理して得ることができる。また、Ｆａｂ’は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、２.（２）、（５）および（６）に記載の抗体のＶ領域をコードするＤＮＡを、Ｆａｂ’発現用ベクターにクローニングし、Ｆａｂ’発現ベクターを作製することができる。Ｆａｂ’発現用ベクターとしては、２.（２）、（５）および（６）に記載の抗体のＶ領域をコードするＤＮＡを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、ｐＡＫ１９（Ｃａｒｔｅｒ Ｐ.ｅｔ ａｌ.，Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０，１６３－１６７（１９９２））等があげられる。Ｆａｂ’発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にＦａｂ’を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるＦａｂ’とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破砕し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破砕液からは、プロテインＧカラム等を用いることにより、均一なＦａｂ’を精製することができる（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ Ｊ.ｅｔ ａｌ.，Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。

（４）ｓｃＦｖの作製

ｓｃＦｖは遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌を用いて作製することができる。例えば、２.（２）、（５）および（６）に記載の抗体のＶＨおよびＶＬをコードするＤＮＡを、１２残基以上のアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカーをコードするＤＮＡを介して連結し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを作製する。ポリペプチドリンカーは、その付加がＶＨ、ＶＬの抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えばＰａｎｔｏｌｉａｎｏらにより示されたもの（Ｐａｎｔｏｌｉａｎｏ Ｍ.Ｗ.ｅｔ ａｌ.，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３０，１０１１７－１０１２５（１９９１））あるいはそれを改変したものを用いることができる。

作製したＤＮＡをｓｃＦｖ発現用ベクターにクローニングし、ｓｃＦｖ発現ベクターを作製することができる。ｓｃＦｖ発現用ベクターとしては、ｓｃＦｖのＤＮＡを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、ｐＣＡＮＴＡＢ５Ｅ（アマシャム・バイオサイエンシズ社製）、Ｐｈｆａ（Ｌａｈ Ｍ.ｅｔ ａｌ.，Ｈｕｍ.Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，５，４８－５６（１９９４））等があげられる。ｓｃＦｖ発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面にｓｃＦｖがファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、ｓｃＦｖ発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層にｓｃＦｖを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質

で用いられるリフォールディング法により、活性のあるｓｃＦｖとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破砕し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破砕液からは、陽イオン交換クロマトグラフィー等を用いることにより、均一なｓｃＦｖを精製することができる（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。

（５）Ｄｉａｂｏｄｙの作製

Ｄｉａｂｏｄｙは、上記のｓｃＦｖを作製する際のポリペプチドリンカーを３～１０残基程度にすることで、作製することができる。１種類の抗体のＶＨおよびＶＬを用いた場合には、２価のＤｉａｂｏｄｙを、２種類の抗体のＶＨおよびＶＬを用いた場合は、２特異性を有するＤｉａｂｏｄｙを作製することができる（Ｌｅ Ｇａｌｌ Ｆ．ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，４５３，１６４－１６８（１９９９）、Ｃｏｕｒａｇｅ Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，７７，７６３－７６８（１９９８））。

（６）ｄｓＦｖの作製

ｄｓＦｖは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することができる。まず、２．（２）、（５）および（６）に記載の抗体のＶＨおよびＶＬをコードするＤＮＡの適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換されたＤＮＡを作製する。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は２．（６）のＰＣＲを用いた変異導入法により行うことができる。作製した各ＤＮＡをｄｓＦｖ発現用ベクターにクローニングし、ＶＨおよびＶＬの発現ベクターを作製することができる。ｄｓＦｖ発現用ベクターとしては、ｄｓＦｖ用のＤＮＡを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、ｐＵＬＩ９（Ｒｅｉｔｅｒ Ｙ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，７，６９７－７０４（１９９４））等があげられる。ＶＨおよびＶＬの発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にＶＨおよびＶＬを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からＶＨおよびＶＬを得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、ジスルフィド結合を形成させ、活性のあるｄｓＦｖとすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、さらに精製することができる（Ｒｅｉｔｅｒ Ｙ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，７，６９７－７０４（１９９４））。

（７）ＣＤＲを含むペプチドの作製

ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法あるいはｔＢｏｃ法等の化学合成法によって作製することができる。また、ＣＤＲを含むペプチドをコードするＤＮＡを作製し、作製したＤＮＡを適当な発現用ベクターにクローニングし、ＣＤＲペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、ＣＤＲを含むペプチドをコードするＤＮＡを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、ｐＬＥＸ（インビトロジェン社製）、ｐＡＸ４ａ＋［モビテック（ＭｏＢｉＴｅｃ）社製］等があげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズム層にＣＤＲを含むペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズム層からＣＤＲを含むペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、精製することができる（Ｒｅｉｔｅｒ Ｙ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，７，６９７－７０４（１９９４））。

（８）活性の評価

上記の抗体断片の抗原結合活性は抗体断片を第一抗体として用いた前記１．（２）に記載の酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴（Ｋａｒｌｓｓｏｎ Ｒ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１４５，２２９－２４０（１９９１））等により測定できる。

４．本発明の診断薬、予防薬および治療薬

抗ＣＣＲ４抗体は、末梢血中あるいは炎症局所に浸潤したＣＣＲ４発現細胞の細胞膜表面上に存在するＣＣＲ４蛋白質と結合する。抗ＣＣＲ４抗体はＣＣＲ４の機能を阻害するこ

とにより、ＣＣＲ４陽性細胞の活性化、遊走を阻害する。あるいは、細胞表面に結合した抗ＣＣＲ４抗体のＣＤＣ活性あるいはＡＤＣＣ活性により、ＣＣＲ４発現細胞は傷害を受ける。ＣＣＲ４陽性細胞は、Ｔｈ２細胞とも呼ばれアレルギー性炎症像の形成に重要な働きを担うことが明らかにされている細胞集団を含む。

また、抗ＣＸＣＲ３抗体は、末梢血中あるいは炎症局所に浸潤したＣＸＣＲ３発現細胞の細胞膜表面上に存在するＣＸＣＲ３蛋白質と結合する。抗ＣＸＣＲ３抗体はＣＸＣＲ３の機能を阻害することにより、ＣＸＣＲ３陽性細胞の活性化、遊走を阻害する。あるいは、細胞表面に結合した抗ＣＸＣＲ３抗体のＣＤＣ活性あるいはＡＤＣＣ活性により、ＣＸＣＲ３発現細胞は傷害を受ける。ＣＸＣＲ３陽性細胞は、Ｔｈ１細胞とも呼ばれ炎症像の形成に重要な働きを担うことが明らかにされている細胞集団を含む。

従って、抗ＣＣＲ４抗体および／または抗ＣＸＣＲ３抗体を含む医薬は炎症疾患の１つである間質性肺炎の診断、予防および治療に用いることができる。

炎症疾患では、炎症局所に浸潤するＴｈ２細胞とＴｈ１細胞の比率が著しく不均衡になることにより、病態が進行するとされている。そこで、後述５に示す判別方法を用いることにより、Ｔｈ２細胞とＴｈ１細胞の割合を把握して、過剰な浸潤細胞を傷害することにより、間質性肺炎の炎症、炎症反応後に惹起される肺繊維化、更には呼吸機能の低下を診断、予防および治療することができる。

抗ＣＣＲ４抗体の診断、予防または治療対象としては、定型例特発性間質性肺炎など、炎症部位にＴｈ１細胞よりもＴｈ２細胞の浸潤が過剰に見られる疾患に有効である。

抗ＣＸＣＲ３抗体の診断、予防または治療対象としては、非定型例特発性間質性肺炎、慢性関節リウマチ、皮膚筋炎、多発性筋炎などの膠原病における間質性肺炎など、炎症部位にＴｈ２細胞よりもＴｈ１細胞の浸潤が過剰に見られる疾患に有効である。

また、炎症局所に浸潤するＴｈ２細胞とＴｈ１細胞の比率が均衡であっても病態が進行している場合には、浸潤するＴ細胞を傷害することにより間質性肺炎の炎症、炎症反応後に惹起される肺繊維化、更には呼吸機能の低下を予防、治療することができる。

なお「抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体を有効成分として含有する」医薬の形態としては、いかなるものであってもよいが、例えば合剤、抗ＣＣＲ４抗体と抗ＣＸＣＲ３抗体とを結合させたもの、抗ＣＣＲ４抗体と抗ＣＸＣＲ３抗体を別々に含むキットの形態などがあげられる。

ヒト化抗体は、ヒト以外の動物のモノクローナル抗体と比較して、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において高い効果を示し、かつ免疫原性が低く、その効果が長期に渡り持続することが期待されるので、予防薬および治療薬として好ましい。

抗ＣＣＲ４抗体および／または抗ＣＸＣＲ３抗体を含有する医薬は、予防薬または治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、関節内、および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは関節内および静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形

剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体またはペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体またはペプチドを微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体またはペプチドおよび用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人１日当たり１０μｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇである。

抗ＣＣＲ４抗体をモデル動物に投与する際の剤型および投与経路としては、対象となるモデル動物の性質や重篤度に応じて適宜選択することができる。例えば、それらをそのまま、または他の薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、希釈剤等と共に、モデル動物に対して、経口的または非経口的（腹腔内、静脈内、関節内、筋肉内、皮下投与等）に投与することができる。

抗ＣＣＲ４抗体の配合量並びに投与量は、その製剤の投与方法、投与形態、使用目的、モデル動物の具体的症状、モデル動物の体重等に応じて個別に決定され、特に限定されないが、投与量として、１日当たり概ね１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ程度を、投与間隔として１日１回程度でも可能であり、１日２～４回、またはそれ以上の回数に分けて投与することもできる。また、例えば点滴等により連続的に投与することも可能である。関節等の局所に投与する場合には、１個所に概ね１ｐｇから１００ｍｇを投与する。

５．定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別する方法および判別する診断薬

抗ＣＣＲ４抗体は、ＣＣＲ４と特異的に結合し、ＣＣＲ４陽性細胞を検出および定量できる。また、抗ＣＸＣＲ３抗体は、ＣＸＣＲ３と特異的に結合し、ＣＸＣＲ３陽性細胞を検出および定量できる。

特発性間質性肺炎患者のうち、定型例特発性間質性肺炎患者の肺組織では、ＣＸＣＲ３陽性細胞数に比べてＣＣＲ４陽性細胞数が増加している。一方、非定型例特発性間質性肺炎患者の肺組織では、ＣＣＲ４陽性細胞数に比べてＣＸＣＲ３陽性細胞が増加している。したがって、特発性間質性肺炎患者の生体試料に抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体とを反応させることにより、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別することができる。

また、本発明の診断薬は、ＣＣＲ４陽性細胞とＣＸＣＲ３陽性細胞を判別することができるため、間質性肺炎患者のなかでも、ＣＣＲ４陽性細胞の浸潤が有意な患者とＣＸＣＲ３陽性細胞の浸潤が有意な患者とを判別し、上述の４の治療薬の選定を行うことができる。

生体試料としては、バイオプシー等で被験者より採取した肺組織切片、該細胞または組織より調製した細胞抽出液、血液などがあげられる。

本発明の診断薬に使用される抗ＣＣＲ４抗体としては、ＣＣＲ４に特異的に結合する抗体であればいかなるものでもよく、本発明で使用される抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、遺伝子組換え抗体またはそれらの抗体断片などいかなるものも包含される。遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型ＣＤＲ移植抗体などのヒト化抗体があげられる。抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、Ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖおよびＣＤＲを含むペプチド等があげられる

抗ＣＣＲ４抗体および／または抗ＣＸＣＲ３抗体を含有する診断薬は、下記に示すような

判定方法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩等があげられる。検出用試薬としては、抗ＣＣＲ４抗体または抗ＣＸＣＲ３抗体を認識する標識された二次抗体、標識に対応した基質等の通常の免疫学的検出法に用いられる試薬があげられる。

抗ＣＣＲ４抗体または抗ＣＸＣＲ３抗体を用いて生体試料に浸潤しているＣＣＲ４陽性細胞またはＣＸＣＲ３陽性細胞を免疫学的に検出および／または定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射性物質標識免疫抗体法（ＲＩＡ）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチＥＬＩＳＡ法（富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）、日本生化学会，続生化学実験講座５，免疫生化学研究法，東京化学同人（１９８６））等を用いることができる。

蛍光抗体法は、文献（Ｇｏｄｉｎｇ Ｊ．Ｗ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７））等に記載された方法を用いて行うことができる。具体的には、分離した細胞あるいは組織等に、抗ＣＣＲ４抗体を反応させ、さらにフルオレセイン・イソチオシアネート（ＦＩＴＣ）あるいはフィコエリスリン等の蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）は、分離した細胞あるいは組織等に、抗ＣＣＲ４抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（ＲＩＡ）は、分離した細胞あるいは組織等に、抗ＣＣＲ４抗体を反応させ、さらに放射性同位体標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、シンチレーションカウンター等で放射能を測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法は、分離した組織等に、抗ＣＣＲ４抗体を反応させ、さらにＦＩＴＣ等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素等で標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させ、酵素標識の場合は酵素反応により発色する基質を加えて反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法であり、文献（Ｇｏｄｉｎｇ Ｊ．Ｗ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７））等に記載された方法を用いて行うことができる。

ウェスタンブロッティングは、分離した細胞あるいは組織等をＳＤＳを含むサンプル用緩衝液に溶解させてＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動したのち、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜に転写し、抗ＣＣＲ４抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色あるいは化学発光する基質を加えて反応させ、バンドとして検出する方法である。

免疫沈降法は、分離した細胞あるいは組織の破砕液とビーズ等に固定化した抗ＣＣＲ４抗体を反応させ、遠心等によりビーズを単離した後、ビーズをＳＤＳを含むサンプル用緩衝液で処理して、溶解させたＣＣＲ４をウェスタンブロッティング等により検出する方法である。

サンドイッチＥＬＩＳＡ法はエピトープがそれぞれ異なる２種類の抗ＣＣＲ４抗体を用いた酵素免疫測定法の一種である。一方の抗ＣＣＲ４抗体をプレート上に固定し、分離した細胞あるいは組織の破砕液を反応させた後、プレート上の抗ＣＣＲ４抗体に結合したＣＣＲ４にさらにもう一方の抗ＣＣＲ４抗体を反応させる。ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

以下に、本発明の実施例、参考例により、本発明を説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

実施例１　抗ＣＣＲ４抗体を使用した特発性間質性肺炎患者肺組織の染色

炎症局所ではＴ細胞が集積される。そこでＴｈ１細胞の細胞表面に発現するＣＸＣＲ３、およびＴｈ２細胞の細胞表面に発現するＣＣＲ４にそれぞれ反応する抗体を用いて、特発性間質性肺炎患者の肺組織に集積されるＴ細胞を染色した。

特発性間質性肺炎患者（１４例）より採取した肺組織より、文献の方法（Ｈｉｓｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ　ｓｅｌｆ－ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ　ｔｅｓｔ．ＡＳＣＰ　Ｐｒｅｓｓ（１９９０））に従いパラフィン切片を作製した。

６．３２μｇ／ｍｌマウス抗ＣＣＲ４抗体ＫＭ２１６０、６．３２μｇ／ｍｌ抗ＣＸＣＲ３抗体（ファーミンジェン社製）および市販の免疫組織染色キット（ＳＳ　ＭｕｌｔｉＬｉｎｋ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ，ＢｉｏＧｅｎｅｘ社製）を用いて、肺組織パラフィン切片の免疫染色を行った。方法はキットの操作手順書に従った。

ＣＸＣＲ３あるいはＣＣＲ４陽性細胞の数は、繊維性領域でランダムに２０視野を選択し（４００倍拡大）、視野中に存在する抗体陽性の単核球数を計測することにより行った。その結果を第１表に示す。

第１表　特発性間質性肺炎における CXCR3、CCR4 陽性細胞の分布

患者	年齢(才)	診断	陽性細胞数		
			CXCR3	CCR4	CXCR3:CCR4 比
1	74	NSIP	313	2	156.5
2	66	NSIP	395	12	32.9
3	60	NSIP	173	2	86.5
4	74	NSIP	195	12	16.3
5	52	NSIP	347	16	21.7
6	67	NSIP	321	9	35.7
7	67	NSIP	545	7	77.9
8	69	NSIP	274	3	91.3
9	73	NSIP	43	2	21.5
10	74	NSIP	220	31	7.1
11	62	NSIP	285	12	23.8
12	76	NSIP	22	6	3.7
13	73	UIP	43	94	0.46
14	61	UIP	45	66	0.68

UIP：定型例特発性間質性肺炎（usual interstitial pneumonia）

NSIP:非定型例特発性間質性肺炎（Nonspecific interstitial pneumonia）

定型例特発性間質性肺炎患者２例（患者１３および１４）ではＣＣＲ４陽性細胞、すなわちＴｈ２細胞の優位な浸潤が認められた。それに対して、非定型例特発性間質性肺炎患者１２例（患者１－１２）ではＣＸＣＲ３陽性細胞、すなわちＴｈ１細胞の優位な浸潤が認められた。

したがって、抗ＣＣＲ４抗体および抗ＣＸＣＲ３抗体を用いることにより、特発性間質性肺炎の診断が可能である。また、Ｔｈ１細胞とＴｈ２細胞の比率を調べることにより、抗ＣＣＲ４抗体と抗ＣＸＣＲ３抗体を用いて浸潤したＴｈ１細胞とＴｈ２細胞の比率を調べ

ることにより、定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎との判別が可能である。
また、抗ＣＣＲ４抗体を用いることにより、定型例特発性間質性肺炎を治療することも可能であること、抗ＣＸＣＲ３抗体を用いることにより、非定型例特発性間質性肺炎を治療することも可能であることが示唆された。
実施例２　抗ＣＣＲ４抗体を使用した膠原病患者の間質性肺炎肺組織の染色
膠原病患者は間質性肺炎を患っていることが多い。そこで、実施例１と同様に、Ｔｈ１細胞の細胞表面に発現するＣＸＣＲ３、およびＴｈ２細胞の細胞表面に発現するＣＣＲ４にそれぞれ反応する抗体を用いて、皮膚筋炎、多発性筋炎、全身性硬化症（強皮症）、慢性関節リウマチなどの膠原病で間質性肺炎を併発する患者の肺組織に集積されるＴ細胞を染色した。
膠原病患者間質性肺炎（ＣＶＤ－ＩＰ）の肺組織を、文献の方法（Ｈｉｓｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ　ｓｅｌｆ－ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ　ｔｅｓｔ．ＡＳＣＰ　Ｐｒｅｓｓ（１９９０））に従いパラフィン切片を作製した。抗ＣＣＲ４抗体ＫＭ２１６０、市販抗ＣＸＣＲ３抗体（ファーミンジェン社製）と市販の免疫組織染色キット（ＳＳ　ＭｕｌｔｉＬｉｎｋ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ，ＢｉｏＧｅｎｅｘ社製）を用い、キットの操作手順書に従って組織免疫染色を行った。ＣＸＣＲ３あるいはＣＣＲ４陽性細胞の数は、繊維性領域においてはランダムに５視野を選択し（４００倍拡大）、視野中に存在する抗体陽性の単核球数を計測することにより行った。リンパ濾胞領域に関しても同じく５視野を選択して計測を行った。その結果を第２表に示す。

第２表　CVD-IPにおけるCXCR3、CCR4陽性細胞の分布

患者	年齢（才）	診断	陽性細胞数		
			CXCR3	CCR4	CXCR3:CCR4比
1	64	RA	10	4	2.5
2	68	RA	110	10	11.0
3	89	RA	92	6	15.3
4	59	RA	60	5	12
5	71	RA	208	60	77.6
6	73	RA	309	15	20.6
7	57	RA	48	8	6
8	56	RA	159	41	3.9
9	64	RA	140	25	5.6
10	62	RA	280	10	28
11	72	RA	298	2	149
12	44	DM	80	1	80
13	69	DM	30	3	10
14	45	DM	38	6	6.3
15	56	PM	30	10	3
16	61	PM	51	20	2.6
17	65	PM	41	25	1.6
18	58	PM	138	58	2.4
19	57	DM	19	9	2.1
20	50	SSc	21	1	21.0
21	58	SSc	20	72	0.28
22	56	SSc	17	44	0.39
23	38	SSc	231	46	5.0
24	50	SSc	23	34	0.68
25	41	SSc	41	4	10.0
26	67	SSc	20	20	1
27	60	SSc	96	43	2.2

DM：皮膚筋炎（dermatomyositis）

PM：多発性筋炎（polymyositis）

SSc：全身性硬化症（強皮症）（systemic sclerosis）

RA:慢性関節リウマチ（rheumatoid arthritis）

全身性硬化症患者（患者２０－２７）より採取された肺組織において、ＣＸＣＲ３陽性細胞優位な浸潤を示す症例（患者２０、２３、２５、２７）とＣＣＲ４陽性細胞の優位な浸潤を示す症例（患者２１、２２、２４）とが観察された。

したがって、全身性硬化症患者のうち、ＣＣＲ４陽性細胞の優位な浸潤を示す症例においては、抗ＣＣＲ４抗体が治療薬として有用であり、ＣＸＣＲ３陽性細胞の有意な浸潤を示す症例においては、抗ＣＸＣＲ３抗体が治療薬として有用であることが明らかとなった。

以上の結果は、膠原病患者肺病変の組織染色を行い、患者の病態診断を行うことにより適

切な治療方法を選択することができることを示している。

参考例１　ＣＣＲ４に対するヒト型ＣＤＲ移植抗体（抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体）の作製

１．抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡの設計

（１）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列の設計

まず、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。ＷＯ０１／６４７５４の実施例１に記載の方法に従って作製された抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０を使用し、配列番号２、３および４に示したＶＨのＣＤＲ１、２および３のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のＶＨのＦＲのアミノ酸配列を選択した。配列解析システムとしてＧＣＧ　Ｐａｃｋａｇｅ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ社製）を用いて、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベースをＢＬＡＳＴＰ法（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．，２５，３３８９（１９９７））によりＫＭ２１６０と相同性の高いヒト抗体を検索した。相同性スコアと実際のアミノ酸配列の相同性を比較したところ、ＳＷＩＳＳＰＲＯＴデータベースアクセッションナンバーＰ０１７８１、Ｉｇ　Ｈｅａｖｙ　ｃｈａｉｎ　Ｖ－ＩＩＩ　ｒｅｇｉｏｎ　Ｇａｌ（Ｈｏｐｐｅ．Ｓｅｙｌｅｒｓ．Ｚ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，３５４，１５０５－１５０９（１９７３）；以下、Ｇａｌと称す）が８２．５％を示し、最も相同性の高いヒト抗体であったため、この抗体のＦＲのアミノ酸配列を選択した。ただしデータベース上のＧａｌのＦＲのアミノ酸配列中には、アミノ酸残基が一義的に決定されていない部分（分泌型抗体のＮ末端から２８番目、３０番目）やヒト抗体の配列では出現頻度の低いアミノ酸残基（Ｖ領域の最後の残基であるＴｈｒ）が認められた。そこで、２８番目と３０番目については、マウス抗体ＫＭ２１６０に見られる残基であるＩｌｅとＳｅｒを選択し、Ｖ領域の最後のＴｈｒについては、Ｓｅｒへ置換した。これらのアミノ酸残基は、任意のヒト抗体の配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）においても高頻度に認められることから、ヒト抗体の配列から逸脱するものではない。

以上のようにして決定したヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号２、３および４に示した抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＶＨのＣＤＲ１、２および３のアミノ酸配列を移植し、配列番号１０に記載の抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列Ｇａｌ０を設計した。配列番号１０のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号２４に示した。

また、カバットらによって分類された共通配列を基に抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列を設計した。

カバットらは、既知の様々なヒト抗体のＶＨをそのアミノ酸配列の相同性から３種類のサブグループ（ＨＳＧ　Ｉ～ＩＩＩ）に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられる。そこで、活性の高い抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体のＶＨの３種類のサブグループの共通配列のＦＲのアミノ酸配列のうち、ＫＭ２１６０のＶＨのＦＲのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するＦＲのアミノ酸配列を選択した。第３表には、相同性の検索結果を示した。第３表に示した様に、ＫＭ２１６０のＶＨ領域のＦＲのアミノ酸配列はサブグループＩＩＩと最も高い相同性を有していた。

第３表

ヒト抗体のVHの各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列と
KM2160のVHのFRのアミノ酸配列との間の相同性

HSGI	HSGII	HSGIII
57.47%	50.58%	77.01%

以上の結果から、ヒト抗体のＶＨのサブグループＩＩＩの共通配列のＦＲのアミノ酸配列

の適切な位置に抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＶＨのＣＤＲのアミノ酸配列を移植し、配列番号１１に記載の抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列ＨＶ０を設計した。配列番号１１のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号２５に示した。

（２）ＣＣＲ４に対するヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＬのアミノ酸配列の設計

次に、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＬのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。配列番号５、６および７に示した抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＶＬのＣＤＲ１、２および３のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のＶＬのＦＲのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のＶＬをそのアミノ酸配列の相同性から４種類のサブグループ（ＨＳＧ　Ｉ～ＩＶ）に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）。そこで、ヒト抗体のＶＬの４種類のサブグループの共通配列のＦＲのアミノ酸配列のうち、ＫＭ２１６０のＶＬのＦＲのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するＦＲのアミノ酸配列を選択した。第４表には、相同性の検索結果を示した。第４表に示した様に、ＫＭ２１６０のＶＬのＦＲのアミノ酸配列はサブグループＩＩと最も高い相同性を有していた。

第4表

ヒト抗体のVLの各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列と
KM2160のVLのFRのアミノ酸配列との間の相同性

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
65.00%	82.50%	65.00%	72.50%

以上の結果から、ヒト抗体のＶＬのサブグループＩＩの共通配列のＦＲのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号５、６および７に示した抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＶＬのＣＤＲ１、２および３のアミノ酸配列を移植し、配列番号１２に記載の抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＬのアミノ酸配列ＬＶ０を設計した。配列番号１２のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号２６に示した。

（３）ＣＣＲ４に対するヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬの改変

上記で設計した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列Ｇａｌ０、ＨＶ０およびＶＬのアミノ酸配列ＬＶ０は、選択したヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列に抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＣＤＲのアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般に、ヒト型ＣＤＲ移植抗体では、マウス抗体のＣＤＲのアミノ酸配列の移植のみでは活性が低下してしまうことが多く、それを回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているＦＲのアミノ酸残基のうち、活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基をＣＤＲのアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本参考例においても、活性に影響を与えると考えられるＦＲのアミノ酸残基を同定することを検討した。

まず、上記で設計した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列Ｇａｌ０、ＨＶ０およびＶＬのアミノ酸配列ＬＶ０よりなる抗体Ｖ領域（Ｇａｌ０ＬＶ０およびＨＶ０ＬＶ０）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアＡｂＭ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ社製）を、三次元構造の表示についてはソフトウェアＰｒｏ－Ｅｘｐｌｏｒｅ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ社製）あるいはＲａｓＭｏｌ（Ｇｌａｘｏ社製）を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＶ領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、Ｇａｌ０ＬＶ０またはＨＶ０ＬＶ０のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列において、抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０と異なっている残基について順次、抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０の相当する位置に見られる残基へ改変したアミノ酸配列からなる三次元構造モデルを同様にして構築し、抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０、Ｇａｌ０ＬＶ０またはＨＶ０ＬＶ０および改変体のＶ

領域の三次元構造を比較した。
その結果、Ｇａｌ０ＬＶ０またはＨＶ０ＬＶ０のＦＲのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えると考えられる残基として、Ｇａｌ０では４０番目のＡｌａ、４２番目のＧｌｙ、４３番目のＬｙｓ、４４番目のＧｌｙ、７６番目のＬｙｓ、および９７番目のＡｌａを、ＨＶ０では、２８番目のＴｈｒおよび９７番目のＡｌａを、ＬＶ０では、２番目のＩｌｅ、３番目のＶａｌ、５０番目のＧｌｎ、および８８番目のＶａｌを選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも１つをマウス抗体ＫＭ２１６０に見られるアミノ残基へ改変し、様々な改変を有するヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬを設計した。
まず、ＶＨについては、例えばＧａｌ０の９７番目のＡｌａを改変した配列番号１３で示したＧａｌ１、Ｇａｌ０の４２番目のＧｌｙ、４４番目のＧｌｙを改変した配列番号１４で示したＧａｌ２、Ｇａｌ０の９７番目のＡｌａ、４２番目のＧｌｙ、４４番目のＧｌｙを改変した配列番号１５に示したＧａｌ３、ＨＶ０の２８番目のＴｈｒを改変した配列番号１６に示したＨＶ１、ＨＶ０の９７番目のＡｌａを改変した配列番号１７で示したＨＶ２、およびＨＶ０の２８番目のＴｈｒ、９７番目のＡｌａを改変した配列番号１８で示したＨＶ３をそれぞれ設計した。さらにＶＬについては、例えば２番目のＩｌｅを改変した配列番号１９に示したＬＶ１、３番目のＶａｌを改変した配列番号２０に示したＬＶ２、２番目のＩｌｅおよび３番目のＶａｌを改変した配列番号２１に示したＬＶ３を設計した。配列番号１３～２１のアミノ酸配列をコードする塩基配列を、それぞれ配列番号２７～３５に示した。
２．抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のｃＤＮＡの構築
（１）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨをコードするｃＤＮＡの構築
参考例１の１項（１）で設計した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列Ｇａｌ０をコードするｃＤＮＡをＰＣＲ法を用いて以下の様にして構築した。
まず、設計したアミノ酸配列に配列番号３６に記載の抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＨ鎖の分泌シグナル配列（ＷＯ０１／６４７５４）を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。１つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮し、対応する遺伝子コドンを決定した。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体Ｖ領域のアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡの塩基配列を設計し、更に５’末端と３’末端にＰＣＲ反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列（ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む）を付加した。設計した塩基配列を５’末端側から約１００塩基ずつ計６本の塩基配列に分け（隣り合う塩基配列は、その末端に約２０塩基の重複配列を有する様にする）、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号３７～４２に記載の塩基配列を有する６本の合成オリゴヌクレオチドを合成した（ＧＥＮＳＥＴ社製）。
各オリゴヌクレオチドを最終濃度が０．１μＭとなる様に０．２ｍＭ ｄＮＴＰｓ、１ｍＭ塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに０．４μＭ Ｍ１３ ｐｒｉｍｅｒ ＲＶ（宝酒造社製）、０．４μＭ Ｍ１３ ｐｒｉｍｅｒ Ｍ３（ＧＥＮＳＥＴ社製）および２．５単位のＫＯＤ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴＯＹＯＢＯ社製）を用いて、合計５０μＬとし、ＰＣＲ反応を行った。反応条件は９４℃３０秒間、５５℃３０秒間、７４℃６０秒間のサイクルを３０サイクル、その後７４℃１０分間を１サイクルで行った。該反応液をＱＩＡ ｑｕｉｃｋ ＰＣＲ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。１０単位の制限酵素ＡｐａＩ（宝酒造社製）および１０単位の制限酵素ＮｏｔＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．４７ｋｂのＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片を回収した。
次に、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）の３μｇを１０単位の制限酵素ＡｐａＩ（宝酒造社製）および１０単位の制限酵素Ｎ

ｏｔＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約２．９５ｋｂのＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片を回収した。
次に、上記で得られた抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのＰＣＲ産物のＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片とプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）のＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片を、ＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｖｅｒ．２（宝酒造社製）のＳｏｌｕｔｉｏｎ Ｉを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドＤＮＡを調製し、Ｂｉｇ Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｋｉｔ ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第１図に示したプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２２日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７０９として国際寄託されている。
次に、参考例１の１項（３）で設計したＦＲのアミノ酸残基の改変は以下のように行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体ＫＭ２１６０で見られる遺伝子コドンとなるように行った。
９７番目のＡｌａをＧｌｙに改変する際には、本項で作製したプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０の２５ｎｇを鋳型とし、配列番号４３と４４に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成ＤＮＡ（ＧＥＮＳＥＴ社製）をプライマーとしてそれぞれ終濃度０．４μＭとなるように加え、２．５単位のＫＯＤ ｐｌｕｓ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴＯＹＯＢＯ社製）を用いて、添付の取扱説明書に従い、５０μＬの系でまず９４℃で２分間加熱した後、９４℃１５秒間、５５℃３０秒間、６８℃４０秒間の条件で３５サイクルのＰＣＲ反応を行った。該反応液をＱＩＡ ｑｕｉｃｋ ＰＣＲ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。全量を１０単位の制限酵素ＰｓｔＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた後、１０単位の制限酵素ＤｒａＩＩＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．５８ｋｂのＰｓｔＩ－ＤｒａＩＩＩ断片を回収した。
次に、プラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０の３μｇを１０単位の制限酵素ＰｓｔＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた後、１０単位の制限酵素ＤｒａＩＩＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約２．７ｋｂのＰｓｔＩ－ＤｒａＩＩＩ断片を回収した。
次に、上記で得られたＰＣＲ産物由来のＰｓｔＩ－ＤｒａＩＩＩ断片とプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０由来のＰｓｔＩ－ＤｒａＩＩＩ断片をＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｖｅｒ．２（宝酒造社製）のＳｏｌｕｔｉｏｎ Ｉを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドＤＮＡを調製し、Ｂｉｇ Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｋｉｔ ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第２図に示したプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ１を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ１で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０Ｇａｌ１は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２２日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７１０として国際寄託されている。
４２番目のＧｌｙをＡｓｐに、また４４番目のＧｌｙをＡｒｇに改変する際には、ＰＣＲプライマーとしては配列番号４５に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成ＤＮＡ（ＧＥＮＳＥＴ社製）とＭ１３ ｐｒｉｍｅｒ ＲＶ（宝酒造社製）をプライマーとする

以外は、基本的には上記と同様の方法で実施し、ｐＫＭ２１６０Ｇａｌ２を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ２で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０Ｇａｌ２は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２２日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７１１として国際寄託されている。

また上記３残基全ての改変は、以下のようにして構築した。得られたｐＫＭ２１６０Ｇａｌ１とｐＫＭ２１６０Ｇａｌ２を各約０．５μｇ用いて、１０単位のＮｈｅＩ（宝酒造社製）で３７℃で１時間反応させた後、更にＳｃａＩ（宝酒造社製）で３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ｐＫＭ２１６０Ｇａｌ１由来の約１．３ｋｂのＮｈｅＩ－ＳｃａＩ断片と、ｐＫＭ２１６０Ｇａｌ２由来の約２．０ｋｂの断片を回収した。得られた２種類の断片をＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｖｅｒ．２（宝酒造社製）のＳｏｌｕｔｉｏｎ Ｉを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドＤＮＡを調製し、Ｂｉｇ Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｋｉｔ ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第３図に示したプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ３を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ３で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０Ｇａｌ３は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２２日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７１２として国際寄託されている。

次に、参考例１の１項（１）で設計した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＨのアミノ酸配列ＨＶ０をコードするｃＤＮＡをＰＣＲ法を用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号３６に記載の抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＨ鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。１つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮し、対応する遺伝子コドンを決定した。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体Ｖ領域のアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡの塩基配列を設計し、更に５’末端と３’末端にＰＣＲ反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列（ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む）を付加した。設計した塩基配列を５’末端側から約１００塩基ずつ計６本の塩基配列に分け（隣り合う塩基配列は、その末端に約２０塩基の重複配列を有する様にする）、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号３７、４６～４９、および４２に記載の塩基配列を有する６本の合成オリゴヌクレオチドを合成し（ＧＥＮＳＥＴ社製）、本項に記載したｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０と同様の方法でｐＫＭ２１６０ＨＶ０を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０ＨＶ０で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＨＶ０は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２７日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７１８として国際寄託されている。

２８番目のＴｈｒをＩｌｅに改変する際には、配列番号４６に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号５０に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、また配列番号４７に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号５１に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドｐＫＭ２１６０ＨＶ０の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有するｐＫＭ２１６０ＨＶ１を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０ＨＶ１で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＨＶ１は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２７日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７１９として国際寄託されている。

２８番目のＴｈｒをＩｌｅに、および９７番目のＡｌａをＧｌｙに改変する際には、配列番号４６に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号５０に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、また配列番号４７に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号５１に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、また配列番号４９に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号５２に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドｐＫＭ２１６０ＨＶ０の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有するｐＫＭ２１６０ＨＶ３を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０ＨＶ３で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＨＶ３は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２７日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７２１として国際寄託されている。

９７番目のＡｌａをＧｌｙに改変する際には、以下の様にして構築した。得られたｐＫＭ２１６０ＨＶ０とｐＫＭ２１６０ＨＶ３を各約０．５μｇ用いて、１０単位のＮｈｅＩ（宝酒造社製）で３７℃で１時間反応させた後、更にＳｃａＩ（宝酒造社製）で３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ｐＫＭ２１６０ＨＶ３由来の約１．３ｋｂのＮｈｅＩ－ＳｃａＩ断片と、ｐＫＭ２１６０ＨＶ０由来の約２．０ｋｂの断片を回収した。得られた２種類の断片をＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｖｅｒ．２（宝酒造社製）のＳｏｌｕｔｉｏｎ Ｉを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドＤＮＡを調製し、Ｂｉｇ Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｋｉｔ ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドｐＫＭ２１６０ＨＶ２を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０ＨＶ２で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＨＶ２は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２７日付けでＦＥＲＭ ＢＰ－７７２０として国際寄託されている。

（２）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＬをコードするｃＤＮＡの構築

参考例１の１項（２）で設計した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＬのアミノ酸配列ＬＶ０をコードするｃＤＮＡをＶＨと同様にＰＣＲ法を用いて以下の様にして構築した。ただし、分泌シグナル配列としては、配列番号５３に記載のアミノ酸配列を有する抗ＣＣＲ４マウス抗体ＫＭ２１６０のＬ鎖の配列を用いた（ＷＯ０１／６４７５４）。

まず、配列番号５４～５９に記載の塩基配列を有する６本の合成オリゴヌクレオチドを合成した（ＧＥＮＳＥＴ社製）。各オリゴヌクレオチドを最終濃度が０．１μＭとなる様に５０μＬの反応液に加えて、０．４μＭ Ｍ１３ ｐｒｉｍｅｒ ＲＶ（宝酒造社製）、０．４μＭ Ｍ１３ ｐｒｉｍｅｒ Ｍ４（宝酒造社製）もしくは配列番号６０に示したＭ１３ ｐｒｉｍｅｒ Ｍ３（ＧＥＮＳＥＴ社製）、および２．５単位のＫＯＤ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴＯＹＯＢＯ社製）を用いて、ＰＣＲ反応を行った。この際の反応条件は９４℃３０秒間、５５℃３０秒間、７４℃６０秒間のサイクルを３０サイクル、その後７２℃で１０分間を１サイクルとした。該反応液をＱＩＡ ｑｕｉｃｋ ＰＣＲ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。１０単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）および１０単位の制限酵素ＸｈｏＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．４４ｋｂのＥｃｏＲＩ－ＸｈｏＩ断片を回収した。

次に、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）の３μｇを１５単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）および１５単位の制限酵素ＸｈｏＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約２．９５ｋｂのＥｃｏＲＩ－ＸｈｏＩ断片を回収した。

次に、上記で得られた抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＶＬのＰＣＲ産物のＥｃｏＲＩ－ＸｈｏＩ断片とプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）ＥｃｏＲＩ－ＸｈｏＩ

断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　Ｖｅｒ．２（宝酒造社製）のＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ｉを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドＤＮＡを調製し、Ｂｉｇ　Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｋｉｔ　ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第４図に示したプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ０を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ０で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＬＶ０は、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２２日付けでＦＥＲＭ　ＢＰ－７７１３として国際寄託されている。

次に、参考例１の１項（３）で設計したＦＲのアミノ酸残基の改変は以下に示す方法で行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体ＫＭ２１６０で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

２番目のＩｌｅをＶａｌに改変する際には、配列番号５０に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号６１に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ０の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有する第５図に示したプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ１を得た。プラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ１で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＬＶ１は、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２２日付けでＦＥＲＭ　ＢＰ－７７１４として国際寄託されている。

同様にして３番目のＶａｌをＬｅｕに改変する際には、配列番号５５に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号６２に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、また上記２残基をすべて改変する際には、配列番号５６に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号６３に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いることで目的のプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ２、ｐＫＭ２１６０ＬＶ３をそれぞれ得た。プラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ２で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＬＶ２およびプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ３で形質転換された大腸菌株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＤＨ５α／ｐＫＭ２１６０ＬＶ３は、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に平成１３年８月２２日付けでＦＥＲＭ　ＢＰ－７７１５およびＦＥＲＭ　ＢＰ－７７１６としてそれぞれ国際寄託されている。

（３）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３（Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３７，１０３５（２０００））と参考例１の２項（１）および（２）で得られたプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０およびｐＫＭ２１６０ＬＶ０を用いて抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ２１６０Ｇａｌ０ＬＶ０を以下の様にして構築した。

参考例１の２項（２）で得られたプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ０の３μｇを１０単位の制限酵素ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて５５℃で１時間反応させた後、１０単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．４４ｋｂのＢｓｉＷＩ－ＥｃｏＲＩ断片を回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３の３μｇを１０単位の制限酵素ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて５５℃で１時間反応させた後、１０単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約１２．７５ｋｂのＢｓｉＷＩ－ＥｃｏＲＩ断片を回収した。

次に、上記で得られたｐＫＭ２１６０ＬＶ０由来ＢｓｉＷＩ－ＥｃｏＲＩ断片とプラスミ

ドｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＢｓｉＷＩ－ＥｃｏＲＩ断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　Ｖｅｒ．２（宝酒造社製）のＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ｉを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、第６図に示したプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ２１６０ＬＶ０を得た。

次に、参考例１の２項（１）で得られたプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０の３μｇを１０単位の制限酵素ＡｐａＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた後、更に１０単位の制限酵素ＮｏｔＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．４７ｋｂのＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ２１６０ＬＶ０の３μｇを１０単位の制限酵素ＡｐａＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた後、更に１０単位の制限酵素ＮｏｔＩ（宝酒造社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．４５ｋｂのＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片を回収した。

次に、上記で得られたｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０由来のＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片とプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ２１６０ＬＶ０由来のＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　Ｖｅｒ．２（宝酒造社製）のＳｏｌｕｔｉｏｎ　Ｉを用いて、添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドＤＮＡを調製した。

得られたプラスミドを用い、Ｂｉｇ　Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｋｉｔ　ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて塩基配列の解析を行った結果、目的のＤＮＡがクローニングされている第６図に示したプラスミドが得られたことを確認した。

また、ＨＶ０を含め、その他ＦＲのアミノ酸残基に改変を加えたＶＨおよびＶＬについても同様の方法を用いて発現ベクターを作製した。

具体的には、参考例１の２項（１）で作製したＧａｌ０、Ｇａｌ１、Ｇａｌ２、Ｇａｌ３、ＨＶ０、ＨＶ１、ＨＶ２およびＨＶ３と、参考例１の２項（２）で作製したＬＶ０、ＬＶ１、ＬＶ２およびＬＶ３とをそれぞれ組み合せて以下の発現ベクターであるＧａｌ０ＬＶ０、Ｇａｌ０ＬＶ１、Ｇａｌ０ＬＶ２、Ｇａｌ０ＬＶ３、Ｇａｌ１ＬＶ１、Ｇａｌ１ＬＶ３、Ｇａｌ２ＬＶ１、Ｇａｌ２ＬＶ３、Ｇａｌ３ＬＶ１、Ｇａｌ３ＬＶ３、ＨＶ０ＬＶ０、ＨＶ０ＬＶ１、ＨＶ０ＬＶ２、ＨＶ０ＬＶ３、ＨＶ１ＬＶ０、ＨＶ１ＬＶ１、ＨＶ１ＬＶ２、ＨＶ１ＬＶ３、ＨＶ２ＬＶ０、ＨＶ２ＬＶ３、ＨＶ３ＬＶ０およびＨＶ３ＬＶ３の２２種類の発現ベクターを作製した。

参考例２　抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の動物細胞による発現

１．ＣＯＳ－７細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６５１）を用いた抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の一過性発現

（１）ＣＯＳ－７細胞での一過性発現

1×10^{5}細胞／ｍＬのＣＯＳ－７細胞を１０％のＦＣＳを含むＤＭＥＭ培地（ギブコ社製）にて６ウェルプレート（岩城硝子社製）に２ｍＬ／ウェルずつ分注し、３７℃で一晩培養した。ＯＰＴＩ－ＭＥＭ培地（ギブコ社製）１００μＬに対してＦｕ－ＧＥＮＥ^{TM}　６　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（ロシュ社製）３μＬを加え、さらに参考例１の２項（３）で得られた抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクター１μｇを加えて室温で１５分間放置し、ＤＮＡ－リポソーム複合体を形成させた。該反応液を前述したＣＯＳ－７細胞に滴下し、よく混合した後に３７℃で培養した。培養後、７２時間の時点で培養上清を回収し、培養上清中の抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の活性評価を行った。

（２）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のヒトＣＣＲ４に対する反応性評価

得られた培養上清を以下の方法にて活性評価を行った。

ＷＯ０１／６４７５４の実施例２に従って作製された形質転換体ＫＭ２７６０（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０５４）が生産する抗ＣＣＲ４キメラ抗体ＫＭ２７６０が反応し得るヒトＣＣ

Ｒ４細胞外領域ペプチドとして化合物１（配列番号２３）を選択した。ＥＬＩＳＡ法による活性測定に用いるため、以下の方法でＢＳＡ（Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ　Ａｌｂｕｍｉｎ）（ナカライテスク社製）とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、１０ｍｇのＢＳＡを含むＰＢＳ溶液９００ｍＬに、１００ｍＬの２５ｍｇ／ｍＬ　ＳＭＣＣ（４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシリックアシッドＮ－ヒドロキシサクシンイミドエステル）（シグマ社製）－ＤＭＳＯ溶液をｖｏｒｔｅｘ下で滴下し、３０分間ゆっくりと攪拌した。２５ｍＬ　ＰＢＳで平衡化したＮＡＰ－１０カラム等のゲルろ過カラムに反応液１ｍＬをアプライし、１．５ｍＬのＰＢＳで溶出させた溶出液をＢＳＡ－ＳＭＣＣ溶液とした（A_{280}測定からＢＳＡ濃度を算出）。次に、０．５ｍｇの化合物１に２５０ｍＬ　ＰＢＳを加え、次いで２５０ｍＬ　ＤＭＦを加えて完全に溶解させた後、前述のＢＳＡ－ＳＭＣＣ溶液（ＢＳＡ　１．２５ｍｇ分）をｖｏｒｔｅｘ下で添加して３時間ゆっくり攪拌した。反応液をＰＢＳに対して４℃、一晩透析し、最終濃度０．０５％となるようにアジ化ナトリウムを添加して、０．２２ｍｍフィルターでろ過した後ＢＳＡ－化合物１溶液とした。

９６穴のＥＩＡ用プレート（グライナー社製）に、上述のように調製したコンジュゲートを０．０５μｇ／ｍＬ、５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で一晩放置して吸着させた。ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡを含むＰＢＳ（以下、１％ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）を１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記する）で洗浄後、形質転換株の培養上清を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで６０００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（γ）抗体溶液（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社製）を二次抗体溶液として、それぞれ５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液（２，２’－アジノ－ビス（３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸）アンモニウムの０．５５ｇを１Ｌの０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ４．２）に溶解し、使用直前に過酸化水素を１μＬ／ｍＬで添加した溶液）を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、２０分後に５％ＳＤＳ溶液を５０μＬ／ウェル加えて反応を停止した。その後４１５ｎｍの吸光度を測定した。

また、培養上清中のヒトＩｇＧ抗体の産生濃度を比較するためには抗原としてヤギ抗ヒトＩｇＧ（γ）抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社製）をＰＢＳで２０００倍希釈したものを使用した。

その結果を第７図と第８図に示した。各ヒト化ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体はヒト型キメラ抗体ＫＭ２７６０とほぼ同等の活性を示した。

２．抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記参考例１の２項（３）で得られた抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを用いて抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

（１）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／Ｏ細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５８１）での安定発現

各ヒト化抗体発現プラスミドを制限酵素Ａａｔ ＩＩ（東洋紡績社製）で消化して直線状化した後、１０μｇを4×10^{6}細胞のラットミエローマ細胞株ＹＢ２／Ｏ細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５８１）へエレクトロポレーション法（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０））により導入後、４０ｍＬのＨ－ＳＦＭ（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬ社製）培地（牛胎児血清（ＦＢＳ）を５％添加）に懸濁し、５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～３日間培養した後、Ｇ４１８（ナカライテスク社製）を１ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養し、Ｇ４１８耐性の形質転換株を得た。

（２）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の培養上清からの精製

Ｇ４１８耐性を示す形質転換株が出現し、コンフルエントになった時点でＤａｉｇｏ’ｓ　ＧＦ２１（和光純薬社製）を５％の濃度で含むＨ－ＳＦＭ　３００～１１００ｍＬのＨ－ＳＦＭ培地に交換し、さらに３～５日間培養した。コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約３００～１１００ｍＬよりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（ミリポア社製

）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体を精製し、精製蛋白質を取得した。

３．精製抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の活性評価

（１）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のヒトＣＣＲ４に対する結合活性の測定（ＥＬＩＳＡ法）

参考例２の１項（２）に記載の方法と同様に行った。その結果を第９図に示した。どの抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体もヒト型キメラ抗体ＫＭ２７６０とほぼ同程度の活性を示した。

（２）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のヒトＣＣＲ４高発現細胞との反応性（蛍光抗体法）

参考例１で得られたＣＣＲ４高発現細胞であるＣＣＲ４／ＥＬ－４細胞を2×10^{5}個以上、９６ウェルプレートに分注した。各精製抗体をＦＡＣＳ用緩衝液（１％ＢＳＡ－ＰＢＳ、０．０２％ＥＤＴＡ、０．０５％NaN_3）にて１０μｇ／ｍＬに、さらに非特異的な染色を防ぐためにヒトイムノグロブリン（ウェルファイド社製）を３．７５ｍｇ／ｍＬにそれぞれ希釈した抗体溶液を１００μＬ／ウェルとして加え、氷中で３０分間反応させた。陰性対照としては、抗ヒトＩＬ－５受容体α鎖抗体（ＷＯ９７／１０３５４）を同濃度で反応させた。ＦＡＣＳ用緩衝液にて２００μＬ／ウェルで２回洗浄後、ＰＥ標識抗ヒトＩｇＧ抗体（コールター社製）を１００倍希釈したものを５０μＬ／ウェル加えた。遮光し氷中で３０分間反応後、２００μＬ／ウェルで３回洗浄し、最終的に５００μＬに懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。その結果を第１０図に示した。どの抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体もヒト型キメラ抗体ＫＭ２７６０とほぼ同程度の活性を示した。

（３）抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のヒトＣＣＲ４に対する結合活性の測定（ＢＩＡｃｏｒｅ法）

さらに詳細な結合活性を測定するために、精製した各種抗体の結合活性をＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡＣＯＲＥ社製）を用いて以下のように測定した。なお、試料の希釈及び測定中の緩衝液としてはＨＢＳ－ＥＰ（ＢＩＡＣＯＲＥ社製）を使用した。まずセンサーチップＳＡ（ＢＩＡＣＯＲＥ社製）にビオチン化したＣＣＲ４部分ペプチドである化合物１の０．０１μｇ／ｍＬの溶液５μＬを５μＬ／分の流速で添加し、センサーチップに固定化した。

作製したビオチン化した化合物１の固定化センサーチップに、精製した抗体の４μｇ／ｍＬの溶液の２０μＬを５μＬ／分の流速で添加し、添加終了後、４分間にわたり解離反応をモニターした後、１０ｍＭのＨＣｌの５μＬを２回添加してセンサーチップ表面を再生した。こうして化合物１に対する結合反応曲線（センサーグラム）を得た。

その結果を第１１図に示した。縦軸は、レゾナンス（共鳴）ユニット（ＲＵ）を表し、センサーチップ上の質量変化を意味する。例えば、１０００ＲＵは蛋白質の約１ｎｇ／mm^2の質量変化に相当する。ＫＭ２７６０は、化合物１に対して時間依存的な結合活性を示し、その結合は、解離反応においてほとんど解離が認められないことから、極めて安定、かつ、高い結合活性を有することが示された。一方、各種抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体は、ヒト型キメラ抗体ＫＭ２７６０とほぼ同程度の解離反応を示したが、ＣＣＲ４部分ペプチドである化合物１への結合反応において若干の活性低下が認められた。ＣＤＲのみを移植した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体Ｇａｌ０ＬＶ０は、最も低い結合活性を示し、ＦＲのアミノ酸残基の改変により、結合活性は上昇した。以上の結果は、マウス抗体ＫＭ２１６０のＣＤＲを適切なヒト抗体のＦＲに移植することにより、マウス抗体の抗原結合活性および結合特異性を維持した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体を作製可能であること、さらに、抗体Ｖ領域の三次元構造等を基に結合活性に重要なＦＲのアミノ酸残基を同定し、それらをＣＤＲとともに移植することで、より結合活性の高い抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体を作製できることを示したものである。本参考例で作製した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体は、ＣＣＲ４に対する高い結合活性を有し、かつ、ヒトにおいてマウス抗体、さらには、ヒト型キメラ抗体よりも免疫原性が低下し、高い安全性と高い治療効果を示すことが期待される。

産業上の利用可能性

本発明により、間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬、特に、定型例特発性間質性肺

炎または膠原病における間質性肺炎の予防薬、診断薬または治療薬、および定型例特発性間質性肺炎と非定型例特発性間質性肺炎とを判別する診断薬が提供される。さらに、本発明により、定型例特発性間質性肺炎の非定型例特発性間質性肺炎との判別方法を提供される。

配列フリーテキスト

配列番号１０－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１１－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１２－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１３－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１４－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１５－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１６－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１７－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１８－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号１９－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号２０－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号２１－人工配列の説明：合成ペプチド
配列番号２４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号２５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号２６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号２７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号２８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号２９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３１－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４１－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５１－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号５９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６１－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Agent for diagnosing and treating interstitial pneumonia

<130> P044055

<150> JP 2002-54764
<151> 2002-02-28

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 360
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
  1               5                  10                  15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
             20                  25                  30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
         35                  40                  45

Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
     50                  55                  60

Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn
 65                  70                  75                  80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
                 85                  90                  95

Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
            100                 105                 110

Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
        115                 120                 125
```

Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
130 135 140

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
145 150 155 160

Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
165 170 175

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
180 185 190

Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
195 200 205

Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
210 215 220

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
225 230 235 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
245 250 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
260 265 270

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
275 280 285

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
290 295 300

Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
305 310 315 320

Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
325 330 335

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
340 345 350

Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
355

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Asn Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3
Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5
Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 6
<211> 7

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7
Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr
1 5

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 65

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr
70 75 80 85

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg
100 105 110

Arg

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 12
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 119

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 19
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 20
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 21

```
Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1               5                  10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
             20                  25                  30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
         35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
     50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                 85                  90                  95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 22
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

```
Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
  1               5                  10                  15

Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
             20                  25
```

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

```
Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
```

1 5 10 15

Pro Cys

<210> 24
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

```
gat atc gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga   48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1               5                  10                  15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att   96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
             20                  25                  30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct   144
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
         35                  40                  45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca   192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
     50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc   240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt   288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                 85                  90                  95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa   336
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 27
<211> 357

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 357
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30
gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

```
gat atc ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga   48
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1               5                  10                  15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att   96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
             20                  25                  30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct   144
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
         35                  40                  45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca   192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
     50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc   240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt   288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                 85                  90                  95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa   336
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 32
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

```
gat gtt ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga   48
Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1               5                  10                  15
```

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144

```
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
         35                  40                  45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg   192
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
     50                  55                  60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat   240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65                  70                  75                  80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga   336
Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca                                      357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 34
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

```
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg   48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat   96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
             20                  25                  30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc   144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
```

35 40 45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

<210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36
Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 37
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37
aacagctatg accatggcgg ccgcgacccc tcaccatgaa cctcgggctc agtttgattt 60

tccttgccct cattttaaaa ggtgtccagt gtgaggtg 98

<210> 38
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38
atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggacctcc caggctgtac caagtctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 39
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39
tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60

gggaaggggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtgc 98

<210> 40
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40
acagggagtt cttggcattg tctctggaga tggtgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60

aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgcgacc 98

<210> 41

<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41
acaatgccaa gaactccctg tatctgcaga tgaacagcct gagagtcgag gacacggccc 60

tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 42
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42
gtaaaacgac ggccagtggg ccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60

ggccccaata accaaacgcg aagtttccat cgctat 96

<210> 43
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43
gatggttcac gtagtgg 17

<210> 44
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44
ctgtatctgc agatgaacag cctgagagtc gaggacacgg ccctgtatta ctgtggaaga 60

c 61

<210> 45
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45
gaataagtgc tagcactact aatggttgcg acccactcca gcctcttgtc tggagc 56

<210> 46
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46
gtgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 47
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaat atggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60

gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 48
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 48
acagcgtgtt cttggaattg tctctggaga tggtgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60

aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgagacc 98

<210> 49
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49
acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60

tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 50
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50
atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 51
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 51
tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat atggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60

gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 52
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 52
acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60

tgtattactg tggaagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 53
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 53
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser

<210> 54
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54
aacagctatg accatggaat tcgcctcttc aaaatgaagt tgcctgttag gctgttggtg 60

ctgatgttct ggattcctgc ttccagcagt ga 92

<210> 55
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60

gagtcatcac gatatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 56
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56
ctccatctcc tgcagatcta gtcggaacat tgttcatatt aatggtgaca catatttaga 60

atggtacctg cagaagccag gccagtctcc ac 92

<210> 57
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57
tgtgcctgac ccactgccac tgaacctgtc tgggacccca gaaaatcggt tggaaacttt 60

atagatcagg agctgtggag actggcctgg ctt 93

<210> 58
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58
tggcagtggg tcaggcacag atttcacact gaaaatcagc agagtggagg ctgaggatgt 60

tggggtttat tactgctttc aaggttcact tc 92

<210> 59
<211> 91
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59
gtaaaacgac ggccagtctc gagcgtacgt ttgatttcca ccttggtccc ttggccgaac 60

gtccacggaa gaagtgaacc ttgaaagcag t 91

<210> 60
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 61
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60

gagtcatcac aacatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 62
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60

gagtcatcaa gatatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 63
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60

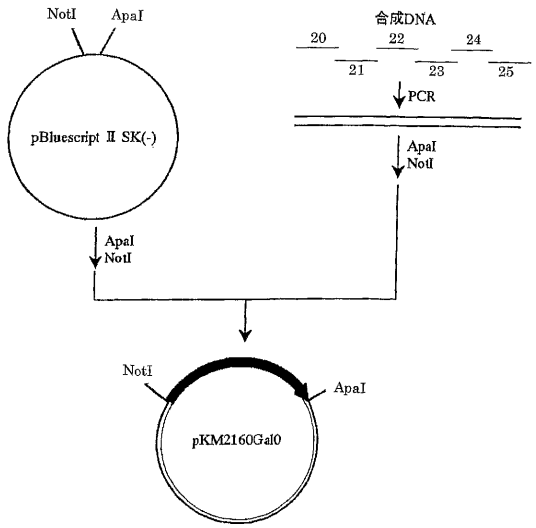
gagtcatcaa aacatcactg ctggaagcag gaat 94

【図面の簡単な説明】
第１図はプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ０の造成工程を示した図である。
第２図はプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ１の造成工程を示した図である。＊は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。
第３図はプラスミドｐＫＭ２１６０Ｇａｌ３の造成工程を示した図である。＊は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。
第４図はプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ０の造成工程を示した図である。
第５図はプラスミドｐＫＭ２１６０ＬＶ１の造成工程を示した図である。＊は、アミノ酸残基を改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。
第６図はプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ２１６０ＬＶ０およびプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ２１

６０Ｇａｌ０ＬＶ０の造成工程を示した図である。
第７図は各抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の発現ベクターをＣＯＳ－７細胞に一過性発現させ、得られた培養上清中のＣＣＲ４部分ペプチドへのＥＬＩＳＡ法における反応性を示した図である。
第８図は別のＦＲを用いて作製した各抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体の発現ベクターをＣＯＳ－７細胞に一過性発現させ、得られた培養上清中のＣＣＲ４部分ペプチドへのＥＬＩＳＡ法における反応性を示した図である。
第９図は精製した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＣＣＲ４部分ペプチドへのＥＬＩＳＡ法における反応性を示した図である。
第１０図は精製した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＣＣＲ４高発現細胞（ＣＣＲ４／ＥＬ－４）に対する反応性を示した図である。
第１１図は精製した抗ＣＣＲ４ＣＤＲ移植抗体のＣＣＲ４部分ペプチドに対する親和性を表面プラズモン共鳴センサーを用いて測定した図である。

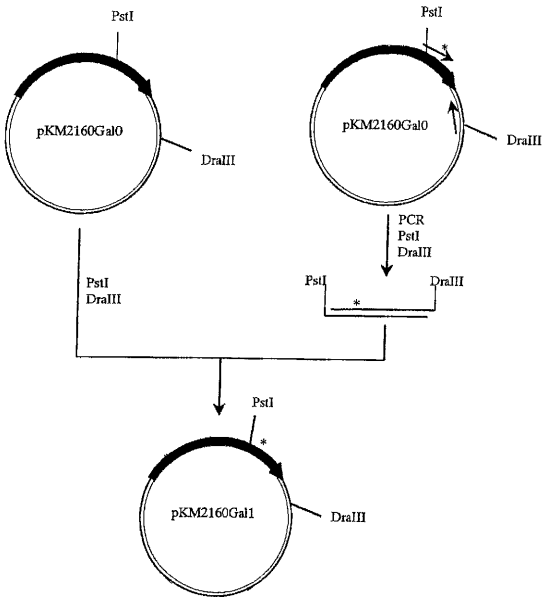
【図１】

第１図



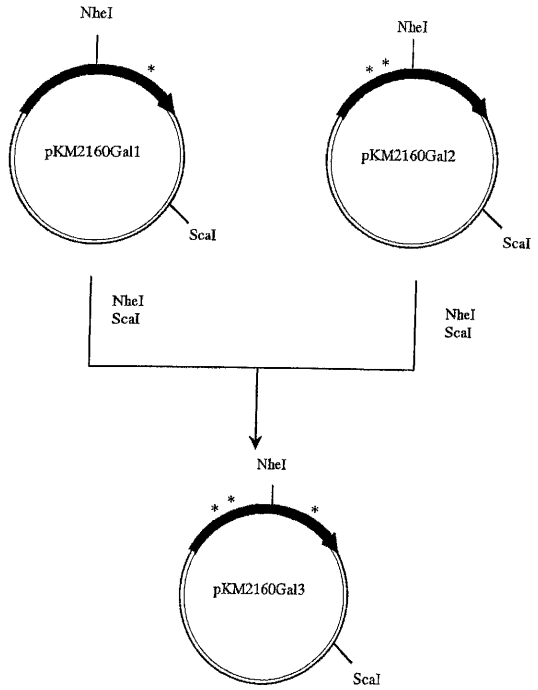
【図２】

第２図



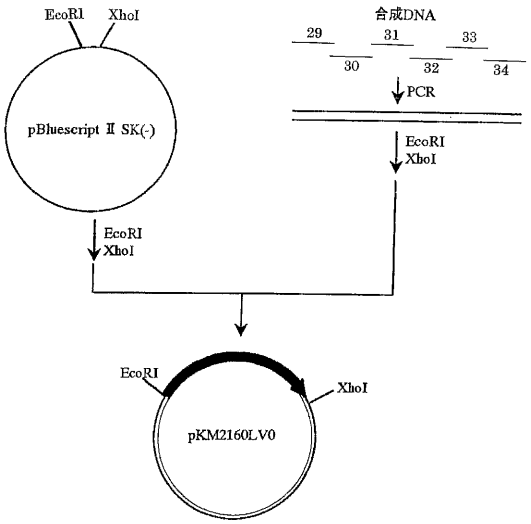
【図３】

第３図



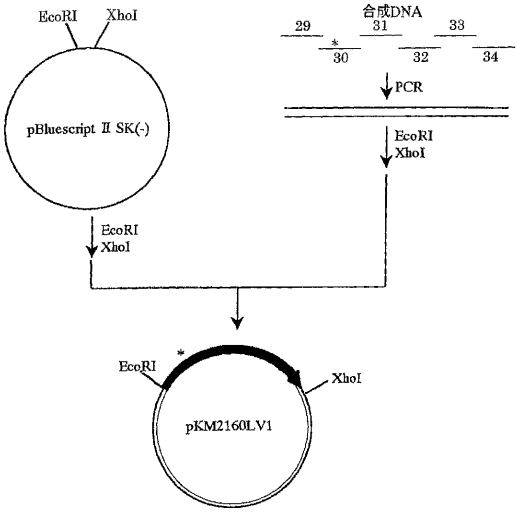
【図４】

第４図



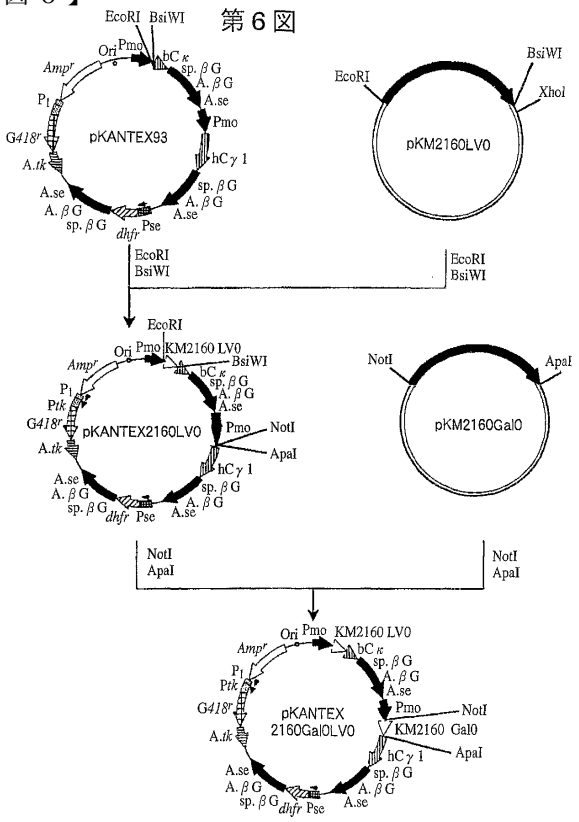
【図５】

第５図

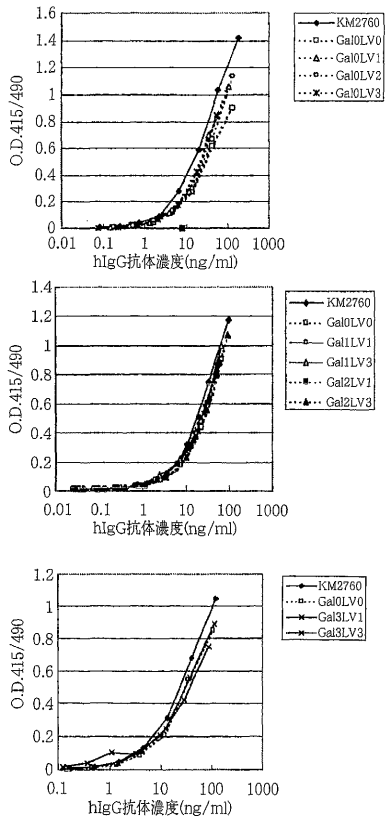


【図６】

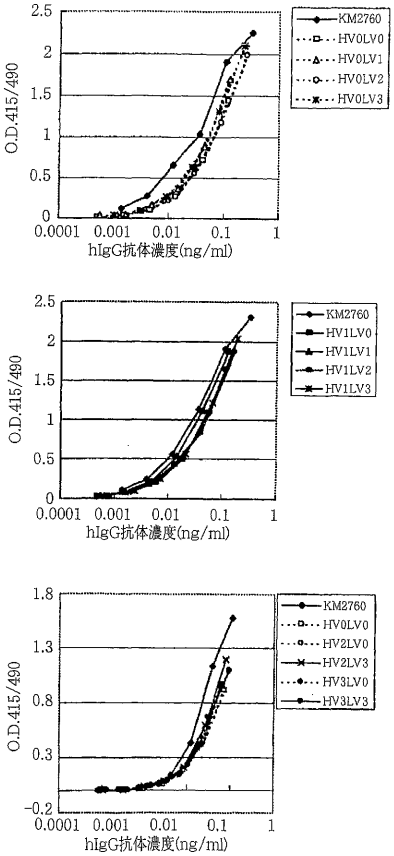
第６図



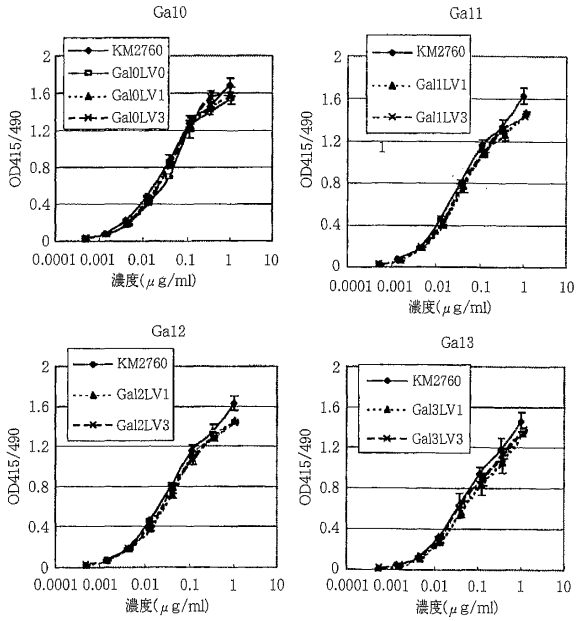
【図７】
第７図



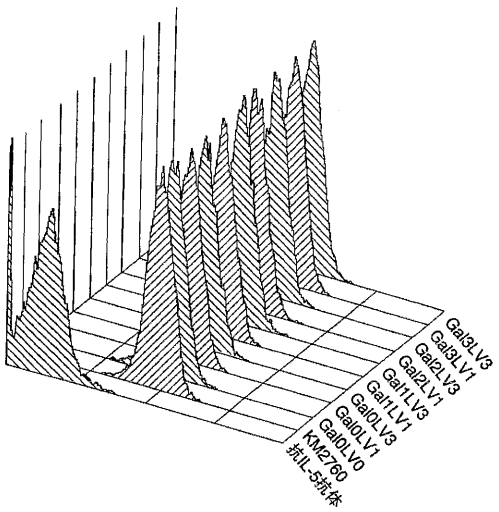
【図８】
第８図



【図９】
第９図

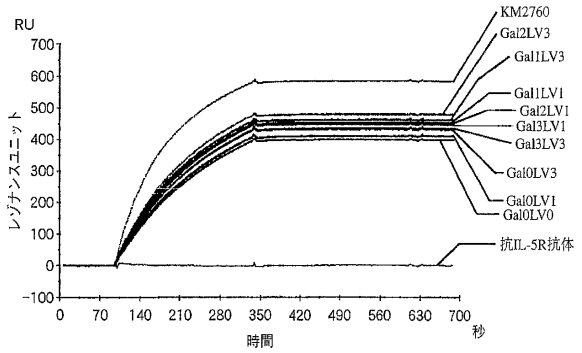


【図１０】
第10図



【図１１】

第11図


RU
700
600
500
400
300
200
100
0
−100
レゾナンスユニット
0
70
140
210
280
350
420
490
560
630
700
秒
時間
KM2760
Gal2LV3
Gal1LV3
Gal1LV1
Gal2LV1
Gal3LV1
Gal3LV3
Gal0LV3
Gal0LV1
Gal0LV0
抗IL-5R抗体

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/02372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K39/395, 38/17, A61P11/00, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] A61K39/00-395, 38/00-58, A61P11/00, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS(STN), BIOSIS(STN), REGISTRY(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 03/018635 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 06 March, 2003 (06.03.03), Full text (Family: none)	1-55
X A	WO 98/11218 A1 (THEODOR-KOCHER INSTITUTE), 19 March, 1998 (19.03.98), Full text; particularly, Claim 27; page 63, line 34 to page 64, line 2 & JP 2002-513388 A	1-3 4-55
Y A	WO 01/64754 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 02 March, 2001 (02.03.01), Full text; particularly, Claim 45 & EP 1270595 A1	1-3,5-17 4,18-55

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 May, 2003 (23.05.03)	17 June, 2003 (17.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/02372

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database MEDLINE on STN, U.S. National Library of Medicine(NLM), (Bethesda, MD, USA), DN:21467902 & BAUGHMAN, R.P. et al., Nonsteroidal Therapy for idiopathic pulmonary fibrosis, Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2001, Vol.7, No.5, pages 309 to 313, abstrace	1-3,5-17
Y A	Database MEDLINE on STN, U.S. National Library of Medicine(NLM), (Bethesda, MD, USA), DN:21467894 & COSTABEL, U. et al., Bronchoaveolar lavage in interstitial lung disease, Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2001, Vol.7, No.5, pages 255 to 261, abstract	1-3,5-17 4,18-55
Y A	Masako MURAI, "Th1/Th2/Balance Seigyo ni okeru Chemokine no Yakuwari", Igaku no Ayumi, 2001 Vol.196, No.12, pages 838 to 842, full text; particularly, table 1	1-3,5-17 4,18-55

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

国際調査報告 | 国際出願番号 PCT/JP03/02372

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁷ A61K39/395, 38/17, A61P11/00, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁷ A61K39/00-395, 38/00-58, A61P11/00, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS (STN) BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN) EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
PA	WO 03/018635 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003.03.06, 全文 (ファミリーなし)	1-55
X	WO 98/11218 A1 (THEODOR-KOCHER INSTITUTE) 1998.03.19, 全文, 特に請求項27, 第63頁第34行－第64頁第2行 & JP 2002-513388 A	1-3
A		4-55
Y	WO 01/64754 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2001.03.02, 全文, 特に請求の範囲45 & EP 1270595 A1	1-3, 5-17
A		4, 18-55

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 23.05.03	国際調査報告の発送日 17.06.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 浜田 麻子 印 4C 2938 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1998年7月）

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP03／02372

C（続き）. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Database MEDLINE on STN, U.S. National Library of Medicine(NLM), (Bethesda, MD, USA), DN:21467902 & BAUGHMAN, R.P. *et al*, Nonsteroidal therapy for idiopathic pulmonary fibrosis, Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2001, Vol.7, No.5, pp309-313, abstract	1-3,5-17
Y A	Database MEDLINE on STN, U.S. National Library of Medicine(NLM), (Bethesda, MD, USA), DN:21467894 & COSTABEL, U. *et al*, Bronchoaveolar lavage in interstitial lung disease, Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2001, Vol.7, No.5, pp255-261, abstract	1-3,5-17 4,18-55
Y A	村井政子, Th1/Th2バランス制御におけるケモカインの役割, 医学のあゆみ, 2001, Vol.196, No.12, pp838-842, 全文, 特に表1	1-3,5-17 4,18-55

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI		
// C07K	16/28	G01N	33/53	S
C12N	15/09	G01N	33/53	Y
		C12N	15/00	ZNAA
		C07K	16/28	

(72)発明者 上田 龍三
愛知県名古屋市名東区社が丘二丁目４１２番地
(72)発明者 佐藤 滋
愛知県名古屋市瑞穂区松月町２－４５メゾン松月３０３
(72)発明者 吉野内 猛夫
愛知県名古屋市昭和区八雲町５０番地八雲シティハウス２０２
(72)発明者 新美 岳
愛知県名古屋市瑞穂区春山町１４－１八事春山ヒルズ１０２
(72)発明者 清水 重喜
愛知県名古屋市瑞穂区駒場町５－９駒場コープ５０１
(72)発明者 栄本 忠昭
愛知県名古屋市天白区音聞山６０７－２Ａ

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。